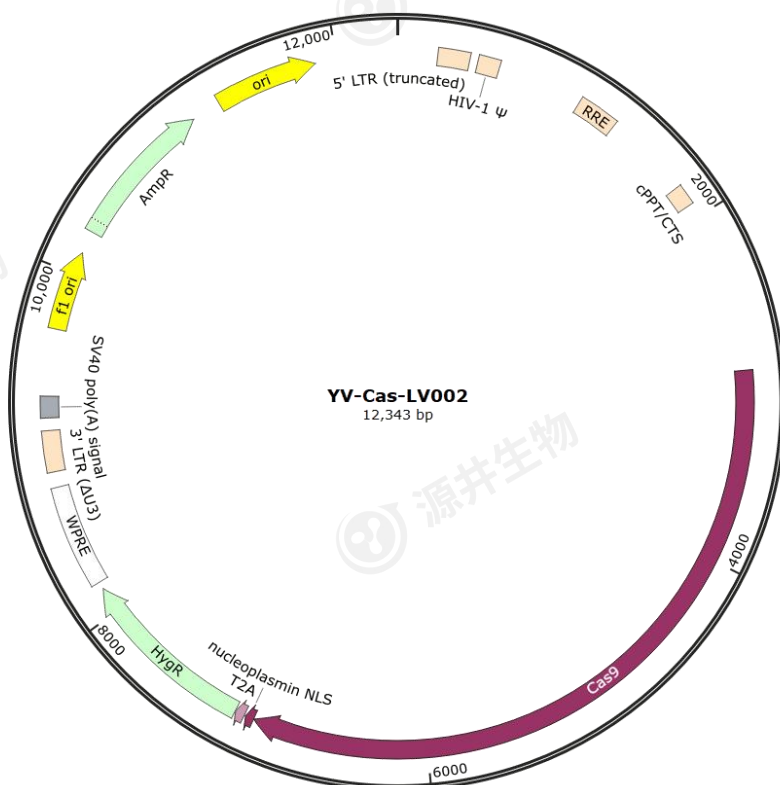


Cas9 慢病毒产品说明书

产品基本信息

货号	YV-Cas-LV002-1000	名称	Cas9 慢病毒 (LV002)
规格	病毒量 1.00E+08TU	荧光抗性	无荧光; Hygro
滴度	≥1.00E+08TU/ml	储存条件	-80℃

载体图谱



产品接收

- 源井生物的 Cas9 慢病毒产品使用干冰运输，收到货物后请把病毒置于-80℃保存，同时避免反复冻融。



- 2) 病毒可在-80°C稳定保存至少 6 个月，若储存时间超过 6 个月，建议在使用前重新测定病毒滴度。
- 3) 促感染试剂 Polybrene 随病毒发货，保存在-20°C。

■ 使用方法

MOI 值：复感染指数，定义为感染时病毒和细胞数量的比值，对于不同种类不同来源的细胞，其最适 MOI 各有差别。一般选择能达到 80%感染效率，并且细胞状态不受影响的 MOI 作为最佳 MOI。对于易感细胞，其 MOI 在 1~10。对于较难感染的细胞，可能需要 20 或更高的 MOI。

Polybrene：一种促感染试剂，其常用浓度为 5~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Polybrene 能通过中和电荷间的相互作用来增强病毒与细胞膜的结合，从而提高病毒的转导效率。但 Polybrene 对于某些细胞有毒性，不同细胞对 polybrene 的敏感度不同，必要的话可以设置几个工作浓度以测试 Polybrene 对靶细胞的毒性。源井生物提供的 Polybrene 的浓度为 0.5 mg/mL，如有需要，使用过程中可用 PBS 或培养液进行稀释。

对于贴壁细胞：

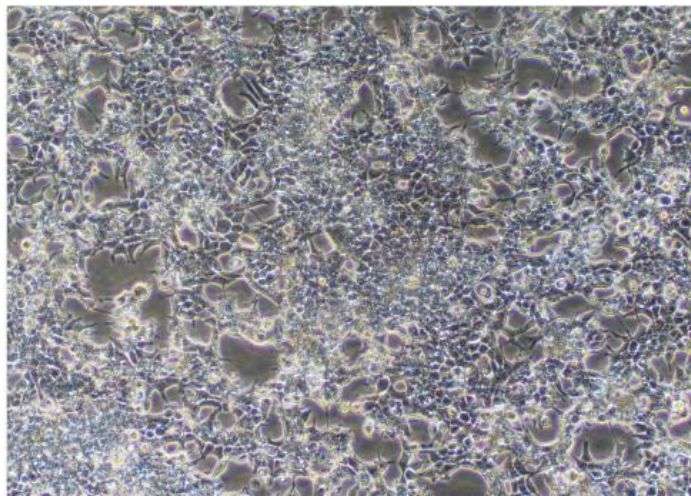
- 1) 病毒转导前一天，准备好 1 个 12 孔板，将细胞消化成单细胞悬液，计数；取 2×10^6 的细胞量，平均分配至 12 孔板，摇晃均匀，置于 37°培养箱培养过夜。使得进行病毒转导当天的细胞汇合率处于 30~50%。
- 2) 取 2~3 个孔的细胞消化成单细胞悬液并进行细胞计数，计算平均每个孔的细胞量 N。
- 3) 将病毒从冰箱取出置于冰上融化，用移液器轻柔吹打混匀。
- 4) 吸去原有培养基，加入 1/2 体积的新鲜培养基，并加入 polybrene 至终浓度为 5~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据病毒的滴度 T (TU/mL) 和细胞量 N 计算所需的病毒体积，直接吸取病毒液加入细胞中，摇晃均匀后放培养箱内继续培养。病毒用量的计算公式为： $V (\mu\text{L}) = 1000 \times \text{MOI} \times N / T$ 。例：如果 MOI=10，病毒滴度为 $4 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$ ，细胞量为 200000，则加入的病毒体积为 5 μL 。
- 5) Cas9 慢病毒共同转导 24 小时后，吸出含有病毒和 Polybrene 的培养液，更换新鲜的完全培养液。



注意：病毒感染时间太长可能会影响细胞状态，这种情况可以将病毒感染时间缩短至 6~8 小时。

- 6) Cas9 慢病毒不携带荧光基因，在病毒感染 48~72 小时后可通过显微镜观察细胞产生病变的面积以判断表达效果。对一些代谢旺盛的细胞（如 293T），病毒感染 24 小时后即可观察到细胞病变。但对于代谢慢的细胞，如原代细胞、MSC 等，则需要更长的时间来产生病变，因此病毒感染 72~96 小时后才能观察到细胞病变。

下图为 Cas9 慢病毒（不携带荧光基因）按 MOI=10 转导 293T 细胞 48h 后拍摄的照片。



- 7) Cas9 慢病毒携带有抗性基因，在病毒感染 48~72 小时后向培养基中加入相应的抗生素，可有效地筛选和富集稳转细胞。抗生素筛选实验还需要设置一孔不加病毒的细胞作为对照，用来判断筛选结束的时间点。每 2-3 天更换含抗生素的完全培养液，直到对照组细胞完全飘起死亡。

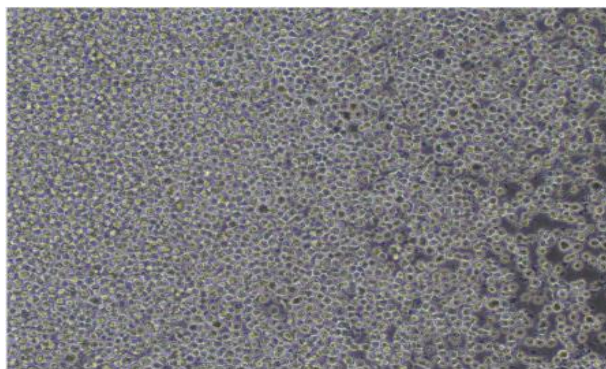
对于悬浮细胞：

- 1) 感染细胞当天准备好 1 个 12 孔板，将细胞吹打混匀，计数；每孔接种 3×10^5 的细胞量，摇晃均匀，即可感染。
- 2) 将病毒从冰箱取出置于冰上融化，用移液器轻柔吹打混匀。
- 3) 加入 polybrene 至终浓度为 $5 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ ，根据病毒的滴度 T (TU/mL) 和细胞量 N 计算所需的病毒体积，直接吸取病毒液加入细胞中，轻柔吹打混匀后放培养箱内继续培养。病毒用量的计算公式为： $V (\mu\text{L}) = 1000 \times \text{MOI} \times N / T$ 。例：如果 MOI=20，病毒滴度为 5×10^8 TU/mL，细胞量为 500000，则加入的病毒体积为 20 μL 。



- 4) CRISPR/Cas9 慢病毒共同转导 24 小时后，离心去除含有病毒和 Polybrene 的培养液，更换新鲜的完全培养液。注意：病毒感染时间太长可能会影响细胞状态，这种情况可以将病毒感染时间缩短至 6~8 小时。
- 5) Cas9 慢病毒不携带荧光基因，在病毒感染 48~72 小时后可通过显微镜观察细胞产生病变的面积以判断表达效果。

下图为 Cas9 慢病毒（不携带荧光基因）按 MOI=20 转导 THP-1 细胞 48h 后拍摄的照片。



- 6) Cas9 慢病毒携带有抗性基因，亦可在病毒感染 48~72 小时后向培养基中加入相应的抗生素，用于筛选 稳转细胞。

注意：为了获得较好的药筛结果，建议进行药筛预实验，用不同浓度的抗生素来测试野生型细胞，制作致死曲线，选出一个可以完全杀死未有效转导的细胞，但又不会影响有效转导细胞的浓度。下表列出了 4 种常用抗生素的药筛浓度以及时间。

抗生素名称	Puromycin	Blasticidin	Hygromycin B	G418
常用工作浓度	1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	400~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
筛选时间	2~3 天	7~10 天	3~5 天	4~7 天

慢病毒使用的安全须知

源井生物生产的慢病毒属于“第三代”慢病毒载体，其基因组的 3' LTR 经过突变形成了所谓的“自失活”（Self-inactivation, SIN），即该病毒基因组整合到细胞基因组后，不会产生新的子代病毒，



因此具有较好的安全性。但该病毒仍具有感染人原代细胞的能力，有潜在的生物学危险。源井生物建议您操作病毒时按照 BSL-2 安全防护水平，穿戴实验服、口罩和手套等防护用具，使用生物安全柜进行实验。接触过病毒的枪头、离心管、培养板、废液等物品可用常规灭菌程序（121°C，20 分钟）进行病毒灭活。

■ 常见问题

1) 慢病毒对目的细胞的感染效率较低，如何提高病毒的感染效率？

一般可以通过提高 MOI 值、延长病毒感染时间、添加 Polybrene 来提高病毒的感染效率。另外，细胞状态也对感染效率有较大影响，良好的细胞状态是获得高感染效率的保证。对于悬浮细胞，还可以通过离心感染。

2) 加入病毒后，目的细胞的状态变差，怎么办？

可能细胞对慢病毒或 Polybrene 比较敏感，请降低感染的 MOI 值、撤除 Polybrene，及时观察细胞状态，调整换液的时间。



