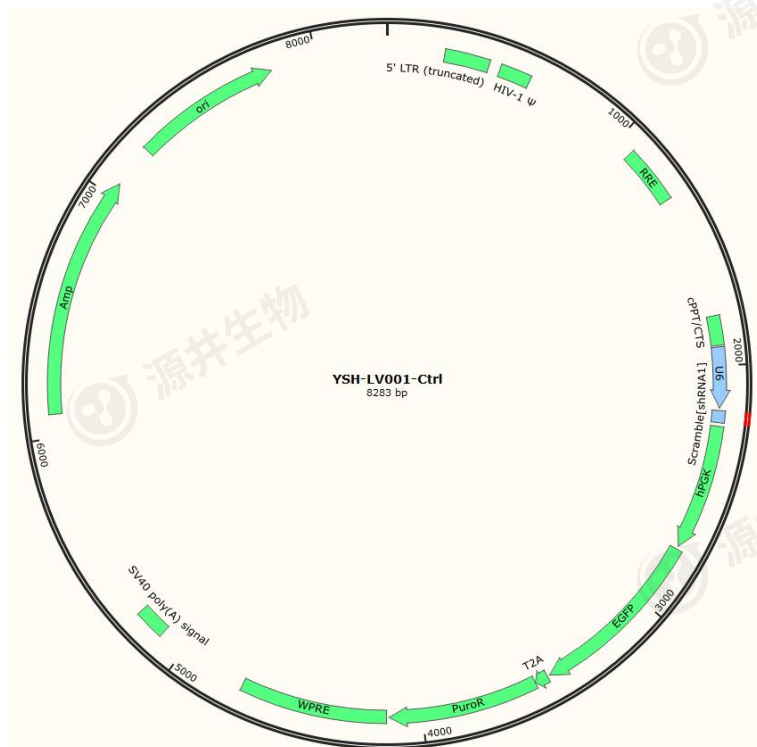


EGFP 慢病毒产品说明书

产品基本信息

货号	YV-SH-LV001-GFP-1000	名称	GFP 慢病毒
规格	1ml	荧光抗性	EGFP; Puro
滴度	$\geq 1.00E+08$	储存条件	-80°C

载体图谱



产品接收

- 1) Ubigene 的慢病毒产品使用干冰运输, 收到货物后请把病毒置于-80°C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。常见细胞的 MOI 见附录。

Polybrene: 一种促感染试剂, 其常用浓度为 $5\sim 8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。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。Ubigen 提供的 Polybrene 的浓度为 $0.5\ \text{mg}/\text{mL}$, 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 $5\sim 8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。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 $\text{MOI}=10$, 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 $5\ \mu\text{L}$ 。

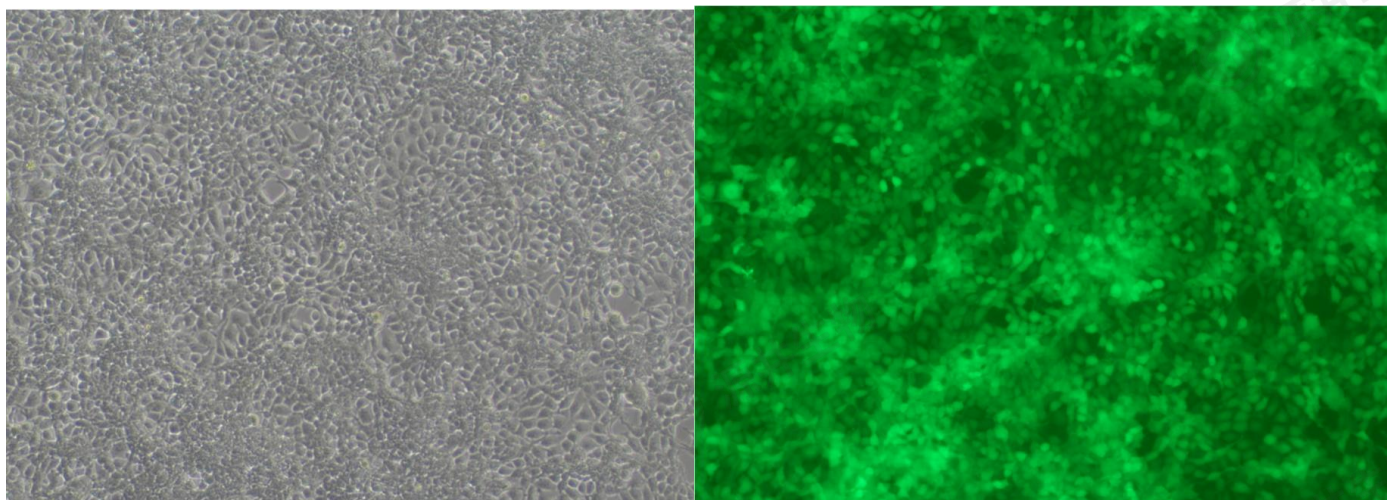


5) 慢病毒共同转导 24 小时后, 吸出含有病毒和 Polybrene 的培养液, 更换新鲜的完全培养液。

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) 慢病毒携带荧光基因, 在病毒感染 48~72 小时后可通过荧光显微镜观察荧光表达效果。

下图为慢病毒 (携带荧光基因) 按 MOI=10 转导 293T 细胞, 48 小时后拍摄的照片。



7) 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。

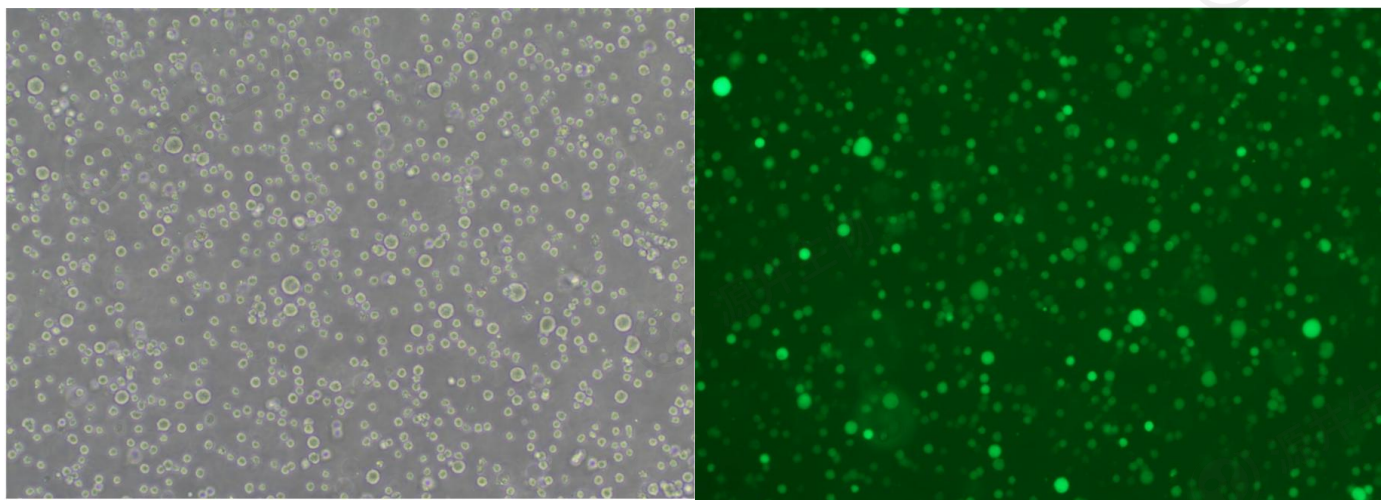
对于悬浮细胞:

- 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 $\text{MOI}=20$, 病毒滴度为 $5 \times 10^8 \text{ TU/mL}$, 细胞量为 500000, 则加入的病毒体积为 20 μL 。



- 4) 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) 慢病毒携带荧光基因，在病毒感染 48~72 小时后可通过荧光显微镜观察荧光表达效果。

下图为慢病毒（携带荧光基因）按 MOI=20 转导 THP-1 细胞，48 小时后拍摄的照片。



- 6) 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 $\mu\text{g/mL}$	5~30 $\mu\text{g/mL}$	100~500 $\mu\text{g/mL}$	400~1000 $\mu\text{g/mL}$
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

Ubigen 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。Ubigen 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。

