

慢病毒颗粒细胞感染
实验用户手册

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

1 慢病毒概述 1
2 慢病毒颗粒的储存、稀释与使用 1
3 慢病毒颗粒的使用安全及注意事项 1
4 实验前的准备工作 3
5 慢病毒颗粒滴度单位换算及MOI值计算 4
6 慢病毒颗粒感染目的细胞预实验 6
7 摸索细胞的最适药物筛选浓度 9
8 实验体系的放大和正式实验 13
9 常见问题（FAQs） 14
10 附：慢病毒颗粒的滴度复核 16
11 附：细胞MOI值参考列表 19

提示：

如您已熟悉慢病毒基本概念及MOI摸索设置，可快速转跳至第6页阅读实验步骤。

概 述

慢病毒属是逆转录病毒科下的一个属，特征是需要较长时间才能培养。慢病毒载体可以将外源基因有效整合到宿主染色体，从而达到持久性表达，对于较难转染的多种细胞如神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞、非分化细胞等，均能极大提高目的基因的转导效率，具有广阔的应用前景。

GeneCopoeia™慢病毒载体相关产品有慢病毒表达克隆、即用型慢病毒颗粒、慢病毒包装及检测相关试剂盒。其中，GeneCopoeia™提供的HIV骨架慢病毒表达系统由第三代慢病毒载体系统优化所得，具有增加病毒颗粒滴度并加强生物安全性的特点。

慢病毒颗粒的储存、稀释与使用

1. 收到病毒颗粒后，建议马上存放于-80℃，一般慢病毒颗粒可在-80℃存放约6-12月。如收到后需马上使用，可将当次需要的用量存放于4℃，并在3天内用完。如保存6个月后使用，请重新检测病毒滴度。
2. 使用慢病毒颗粒时，可从-80℃冰箱取出，冰浴融化，置于4℃备用，并尽快使用。如需要稀释慢病毒颗粒时，可用培养基(含血清或含双抗的培养基不影响病毒感染)进行稀释。
3. 慢病毒颗粒每次冻融会降低大约50%滴度；因此在慢病毒颗粒使用过程中，应避免反复冻融。GeneCopoeia™提供的慢病毒颗粒已分装为每管50uL（对照慢病毒颗粒为每管25ul）的规格，使用方便，省略了二次分装的滴度损失或其它麻烦。可根据具体实验设置，分次取用合适量的慢病毒颗粒。

慢病毒颗粒使用的安全性

GeneCopoeia™提供的慢病毒颗粒属于假病毒，其毒性基因已被剔除并被外源性目的基因取代，在感染宿主细胞后，将不会继续感染其他细胞，也不会利用宿主细胞产生新的慢病毒颗粒。

慢病毒仍然具有潜在的生物学危险，建议不要使用编码已知或可能致癌的基因制作慢病毒。如有疑问，请与我们联系。(联系电话：4006-020-200)

使用注意事项：

1. 请使用生物安全柜进行慢病毒颗粒的相关实验。（如条件受限制，只能使用普通超净工作台操作，请不要打开排风机。）
2. 进行慢病毒相关实验时，请穿实验服，戴双层口罩和双层手套。
3. 进行操作时，注意不要产生气雾或飞溅液体。如工作台受到喷溅的病毒液污染，请立即用1%的SDS溶液擦拭。
4. 进行离心时，应使用密封性好的离心管，或用parafilm膜封口后离心。如条件允许，尽量只使用细胞培养实验室内的离心机。
5. 用显微镜观察细胞感染情况时，先拧紧培养瓶或盖紧培养板，用70%乙醇清理培养瓶或培养板外壁，再置于显微镜下观察拍照。观察完毕后，用70%乙醇清理显微镜实验台。
6. 对废弃的培养基/液，可加入84消毒液（约以1:20稀释），浸泡一天后丢弃。使用过的枪头、离心管、培养板等其他实验用品也可用84 消毒液（约以1:20稀释）浸泡后丢弃，或进行常规灭菌（121℃，20 分钟）后丢弃。
7. 实验结束后，脱掉手套，使用肥皂和水清洗双手；脱掉的实验服需妥善放置或清洗消毒。

慢病毒在体外细胞实验中的应用

在体外(*In vitro*)实验中，由于慢病毒颗粒对各种细胞和组织的亲嗜性不同，在使用GeneCopoeia™慢病毒颗粒前，可查阅相关文献参考慢病毒颗粒对目的细胞的亲嗜性，估计实验所需的慢病毒颗粒用量。如果没有相关文献报道，可以通过感染预实验获得该细胞的感染复数(MOI)算出实验所需的慢病毒用量。

实际上，即使有文献报道数据，由于同种细胞在不同实验的细胞代数、细胞状态和培养条件等差异，所使用细胞的实际MOI和文献记载的MOI并不能精确等同。建议在正式实验前进行预实验，以了解慢病毒颗粒对细胞状态和传代的影响。

实验前的准备工作：

1. 查找相关文献，获得目的细胞的培养条件、生长形态、MOI参考值和最小致死浓度(MLC)参考值；
2. 收到GeneCopoeia™邮寄包裹时，请马上检查包裹情况。如有干冰耗尽、管子破裂、管盖脱落的现象，请拍下照片，尽快和我们联系；
3. 建议同时培养目的细胞和293T工具（对照）细胞，并同时进行感染操作。以293T细胞作为对照，可排除由于操作失当或慢病毒质量造成的影响；
4. 传代及培养过程中，注意培养细胞的密度。不同细胞有其最适的培养密度，如293T细胞最适的起始培养密度为2×10^4 - 4×10^4 cells/cm^2，在密度为6×10^4 - 7×10^4 cells/cm^2 时适合进行传代操作。请查看目的细胞的相关文献获得信息，或从ATCC官方网站（http://www.atcc.org/）查找信息；
5. 如慢病毒颗粒储存时间已超过6个月，在再次实验前，建议重新复核滴度（复核滴度的方法请见第16页）；
6. 根据检测要求，选择合适的细胞培养板（见表1）；
7. 使用细胞培养实验室的30分钟前，先对细胞实验室进行紫外消毒。

为预实验选择合适的细胞培养板

表1. 不同检测方法适用的细胞培养板

检测方法 / 培养器皿	荧光观察	qPCR检测	Western Blot
96-well/48-well dish	√		
24-well dish	☆		
12-well dish		√	√
6-well/3.5-cm dish		☆	☆

√ (合适)
☆ (推荐)

Tel: 4006-020-200 Email: sales@igenebio.com Web: www.igenebio.com

滴度与MOI

GeneCopoeia™提供慢病毒颗粒的滴度单位是TU/mL。TU/mL是目前使用最广泛的慢病毒颗粒滴度单位，“TU”为“Transduction Units”的缩写，表示可成功转导目的细胞的基因组数。

MOI是“Multiplicity Of Infection”的缩写，翻译为感染复数或感染指数，含义是成功感染时的慢病毒和细胞数量比值。在实验中，我们也将某个细胞达到80%感染效率所需的MOI值定义为该细胞的MOI值。

慢病毒颗粒用量的取决因素：

慢病毒滴度、MOI、感染体积、细胞密度（融合度）

已知目的细胞的MOI，应使用多少慢病毒？

$$\text{慢病毒量（单位：mL）} = \frac{\text{接触慢病毒的细胞数} \times \text{MOI}}{\text{慢病毒滴度（单位：TU/mL）}}$$

慢病毒颗粒添加量的计算示例：

假设慢病毒滴度=1×10^8 TU/mL，目的细胞MOI= 10，使用6孔板进行实验，接种时的每孔细胞数3×10^5（30%融合度），进行感染时的每孔细胞数约为5×10^5（50%融合度）：

$$\text{慢病毒量添加量} = \frac{\text{接触慢病毒的细胞数} \times \text{MOI}}{\text{慢病毒滴度}} = \frac{5\times10^5\times10}{1\times10^8} = 0.05\ \text{mL} = 50\ \mu\text{L}$$

（更多示例组合请见第5页的表2）

表2. 1×10^8 TU/mL病毒感染细胞所用培养基体积和病毒量参考

	单孔底面积	每孔细胞数*	正常培养体积	感染时的体积	MOI=1的慢病毒量	MOI=10的慢病毒量	MOI=A的慢病毒量
96-well	0.3 cm^2	2.38×10^4	100 μL	100 μL**	0.2 μL	2.4 μL	0.24 X A μL
48-well	0.6 cm^2	4.75×10^4	200 μL	200 μL**	0.5 μL	4.8 μL	0.48 X A μL
24-well	2 cm^2	9.5×10^4	500 μL	500 μL**	1.0 μL	9.5 μL	0.95 X A μL
12-well	4 cm^2	1.9×10^5	1 mL	500 μL	1.9 μL	19 μL	1.9 X A μL
6-well	10 cm^2	4.75×10^5	2 mL	1 mL	4.8 μL	47.5 μL	4.75 X A μL
T25 flask	25 cm^2	1.19×10^6	5 mL	2.5 mL	11.9 μL	118.8 μL	11.9 X A μL

* 表格中的每孔细胞数是根据293T细胞生长至50%融合度估算的。由于不同细胞种类及实验操作存在差异，建议使用细胞计数的方法测算每孔细胞数。建议细胞种籽培养（种板）时的细胞融合度为20-30%，一般以细胞感染3天后生长至80%-90%融合度为宜。

** 通常情况下，在溶液上层的慢病毒颗粒很难接近细胞。减少培养基的感染体积能提高病毒的感染效率。培养 1 天后，再将培养液补充至正常体积。但当细胞板孔较小时，如果感染体积减半，液体的表面张力会使慢病毒颗粒分布不均匀，所以小孔培养板的感染体积和正常培养体积相同。

摸索细胞的最适MOI

以24孔板培养H1299细胞为例，慢病毒颗粒原液滴度为1×10^8 TU/ml。感染的前一天进行种板（如每孔接种5×10^4 细胞），进行感染时的每孔细胞数约为8×10^4，则每孔的慢病毒颗粒添加量见下表。
根据您查找到的MOI值，我们推荐您以该MOI为中心，上下调整摸索组数和彼此梯度。

表3. H1299细胞的MOI摸索梯度示例

MOI梯度摸索组别	稀释说明（慢病毒颗粒滴度=1×10^8 TU/ml 培养体积500 μL）	MOI
1	0.8 μL 慢病毒颗粒原液 + 499.2 μL 培养基	1
2	8 μL 慢病毒颗粒原液 + 492 μL 培养基	10
3	24 μL 慢病毒颗粒原液 + 476 μL 培养基	30
4	40 μL 慢病毒颗粒原液 + 460 μL 培养基	50

注：每个滴度可设置1-3个复孔，一般可选24孔、12孔、或6孔培养板用于预实验。

Tel: 4006-020-200 Email: sales@igenebio.com Web: www.igenebio.com

慢病毒颗粒感染目的细胞预实验

以24孔培养板为例，同时进行目的细胞和工具细胞的感染预实验。工具细胞可选择293T（人胚肾上皮细胞）、H1299（人肺癌细胞）或其它细胞。

实验材料：培养基、24孔培养板，移液枪，枪头， EP管，细胞计数板、冰盒、废液缸等。（根据目的细胞情况，可酌情使用Polybrene）

第一天

准备细胞：培养细胞至对数生长期,细胞以胰酶消化计数后，用细胞计数测出细胞密度，每孔接种5×10^4 个细胞，添加细胞培养液至500 μL。通常情况下，该接种量的H1299或293T细胞在感染后第3天可生长至80%-90%融合度；（接种目的细胞时，请根据细胞的实际生长速度调整接种量，使目的细胞感染后第3天生长至80%-90%融合度）

第二天

1. 准备慢病毒颗粒：按第4-5页的公式计算所需慢病毒颗粒的量，将冻存在 -80℃的慢病毒颗粒取出，冰浴融化；
2. 感染目的细胞：从培养箱中拿出细胞，置于显微镜下观察细胞生长状态及细胞融合度；

如细胞状态较好，则开始实验：
A 用移液枪小心吸去24孔板中的旧培养液，加入新的完全培养液；
b 在细胞中分别加入计算好的慢病毒颗粒液，将培养板平置于工作台上，以划8字的方式轻柔混匀；
c 混匀后，细胞培养板置于 37℃、5% CO_2培养箱，过夜培养。

注意：感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果高低影响很大，所以务必保证在加慢病毒颗粒之前的细胞处于良好的生长状态。

第三天

更换培养液：感染12-16小时后，吸出含慢病毒颗粒的培养液，重新向培养板添加含5%灭活FBS（胎牛血清）的培养液，继续培养。（目的细胞需要调整感染时长，部分细胞不可感染超过12小时，详见14页FAQs）

第四天

继续培养细胞，观察细胞状态是否有异常。

第五天

观察（评估）慢病毒颗粒感染效率：盖紧24孔培养板，使用70%乙醇清理培养板外壁，在倒置荧光显微镜观察荧光，拍照并估计慢病毒颗粒对细胞的感染效率。（如果慢病毒颗粒携带的基因表达所需的时间较长，荧光表达所需时间也较长，建议感染72、96小时后观测荧光表达。）

慢病毒感染细胞的预实验

根据荧光情况，可以初步从MOI梯度摸索实验中，找出最适合目的细胞的MOI值。

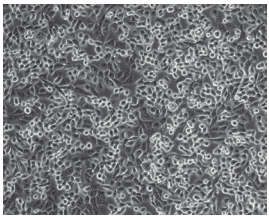
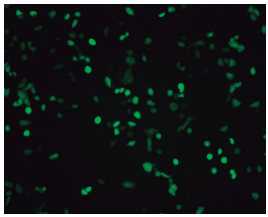
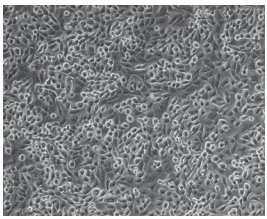
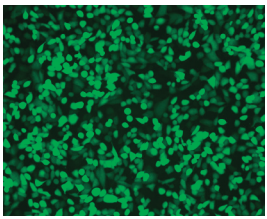
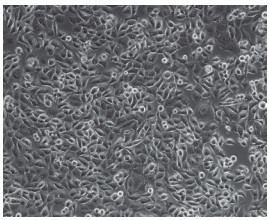
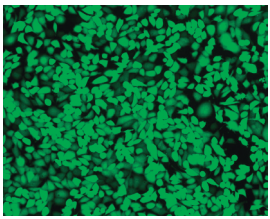
样品组	明视野100×	荧光视野100×
MOI过低		
MOI适中（推荐）		
MOI过高		

图1. H1299细胞的MOI梯度摸索结果示例

示例中使用的慢病毒颗粒是LPP-eGFP-Lv105（滴度1×10^{8}TU/mL），曝光时间1s，显微倍数100×。从上图可见第2组细胞的感染效率已达到90%。由于慢病毒颗粒对细胞有一定毒性，当MOI值过高时，继续添加慢病毒颗粒，感染效率没有明显增加，且细胞状态容易变差、皱缩甚至死亡。

Tel: 4006-020-200 Email: sales@igenebio.com Web: www.igenebio.com

慢病毒感染细胞的预实验

荧光报告基因和目的基因的相对表达并不总是成等比关系的。在有的情况下，即使荧光报告基因表达较低或无表达，目的基因依然能够表达；反之亦然。所以在观察荧光效果后，建议使用qRT-PCR作进一步鉴定。

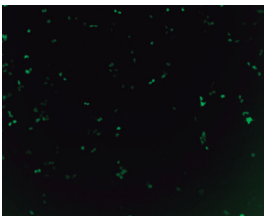
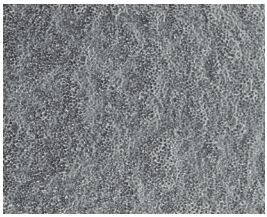
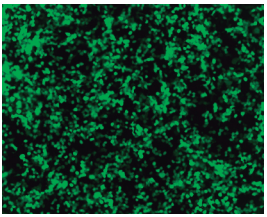
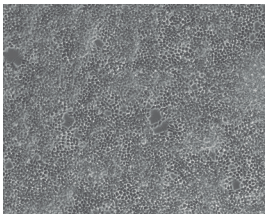
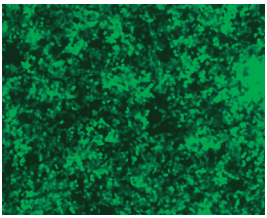
样品组	明视野100×	荧光视野100×
MOI过低		
MOI适中（推荐）		
MOI过高		

图2. 293T细胞的MOI梯度摸索结果示例

示例中使用的慢病毒颗粒是LPP-eGFP-Lv105（滴度1×10^8TU/mL），曝光时间0.6s，显微倍数100×。从上图可见第2组细胞的感染效率已达到80%。由于慢病毒颗粒对细胞有一定毒性，当MOI值过高时，继续添加慢病毒颗粒，感染效率没有明显增加，且细胞状态容易变差、皱缩甚至死亡。

摸索细胞的最适药物筛选浓度

细胞的种类与状态均会影响慢病毒颗粒转导效率，部分细胞可能与慢病毒颗粒有相互抵抗的现象，导致感染效率低。当您在感染后72、96小时后发现感染效果仍不理想，建议对感染后的细胞进行药物筛选（药筛），以收集较多感染成功的细胞。

慢病毒颗粒携带的基因整合到目的细胞基因组是随机发生的非同源性重组，当抗性基因表达时，目的基因不一定也能表达，在进行药筛处理后，还要以qRT-PCR作进一步鉴定。

在进行正式的抗生素筛选前，建议您先对空白细胞的最小致死浓度进行摸索、优化。

表4. 抗生素筛选细胞的相关参考值

	嘌呤霉素 Puromycin	新霉素 Neomycin	潮霉素 Hygromycin
对293T细胞的抗生素参考值	2 μg/mL	600 - 800 μg/mL	100 - 200 μg/mL
建议药筛浓度梯度	0.5 μg/mL 1 μg/mL 1.5 μg/mL 2 μg/mL 5 μg/mL	200 μg/mL 400 μg/mL 600 μg/mL 800 μg/mL 1000 μg/mL	100 μg/mL 200 μg/mL 300 μg/mL 500 μg/mL 1000 μg/mL
通常的药筛时间	3天	7天	5-7天
建议观察时间	第1次观察：第2天 第2次观察：第3天 之后每天观察	第1次观察：第3天 第2次观察：第5天 之后隔天或每天观察	第1次观察：第3天 第2次观察：第5天 第3次观察：第7天 之后隔天或每天观察

Tel: 4006-020-200 Email: sales@igenebio.com Web: www.igenebio.com

摸索细胞的最适药物筛选浓度

以293T细胞+Puromycin为例，从相关文献查得Puromycin对293T细胞的最小致死浓度为2 μg/mL。在2 μg/mL附件多设置几个浓度梯度，可以得出较精确的的筛选浓度。

1. 准备24孔培养板，按每孔1-5×10^4 细胞数(约等于20%-35%融合度)接种293T空白细胞，对其中6个孔进行铺板；
2. 一般Puromycin母液的浓度是10 mg/mL，用细胞培养基将Puromycin母液稀释1000倍，可获得终浓度为10 μg/mL的Puromycin稀释液；
3. 按表5所示，每孔添加相应的细胞培养基和Puromycin；
4. 24孔培养板置于 37℃、5% CO_2培养箱，培养过夜；
5. 按表4的药筛时间和观察时间建议，定期在荧光显微镜下观察细胞状态。

当空白细胞刚好能全部死亡时，该浓度的抗生素可作为最适药筛浓度。

表5. 药物筛选浓度梯度参考（Puromycin）

组别	组别设置	Puromycin终浓度
1	250 μL Puromycin 稀释液* + 250 μL 细胞培养液	5 μg/mL
2	100 μL Puromycin 稀释液* + 400 μL 细胞培养液	2 μg/mL
3	75 μL Puromycin 稀释液* + 425 μL 细胞培养液	1.5 μg/mL
4	50 μL Puromycin 稀释液* + 450 μL 细胞培养液	1 μg/mL
5	25 μL Puromycin 稀释液* + 475 μL 细胞培养液	0.5 μg/mL
6	500μL细胞培养液	0 μg/mL

* 表格中使用的Puromycin浓度为10 μg/mL，是由10 mg/mL的Puromycin母液以细胞培养液稀释1000倍所得。

注：以上表格的设置仅供参考。通常即使细胞一样，由于培养的条件和传代次数不一样，筛选浓度亦不一样。可根据试验结果进行更进一步的细化浓度梯度设置。
如果药筛过程中细胞量较少，为保持细胞的数一定，一般不换液，只有在稳转株药筛过程中，根据细胞生长速度，3-4天换液一次。

如果目的细胞较难感染，一次感染不能达到预期效果时，在感染3天后可对目的细胞进行药筛处理，获得较多被感染的细胞，如以下例子所示：

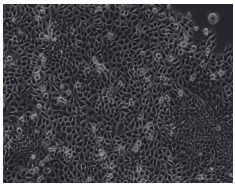
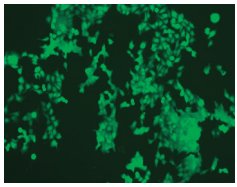
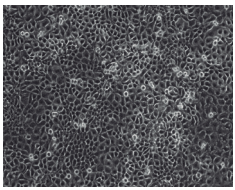
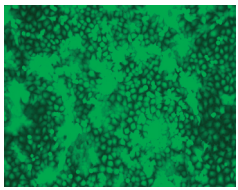
样品组	明视野100×	荧光视野100×
慢病毒感染3天后（药筛前）		
药筛后		

图3. 人食管癌细胞CE-81T（贴壁细胞）的药筛前后效果对比

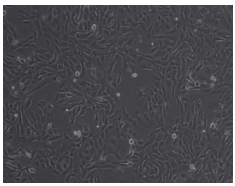
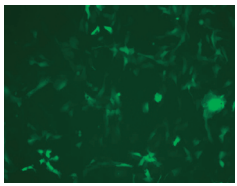
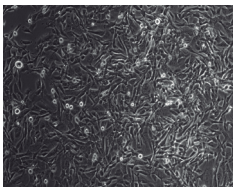
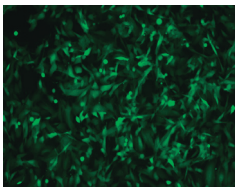
样品组	明视野100×	荧光视野100×
慢病毒感染3天后（药筛前）		
药筛后		

图4. 人骨肉瘤细胞Hos（贴壁细胞）的药筛前后效果对比

Tel: 4006-020-200 Email: sales@igenebio.com Web: www.igenebio.com

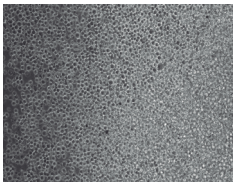
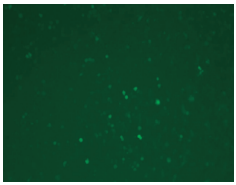
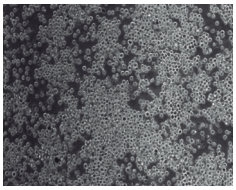
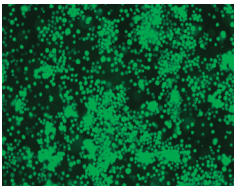
样品组	明视野100×	荧光视野100×
慢病毒感染3天后（药筛前）		
药筛后		

图5. 人白血病细胞K562（悬浮细胞）的药筛前后效果对比

附：细胞融合度参考

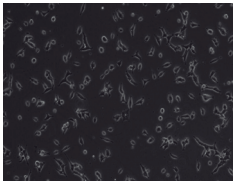
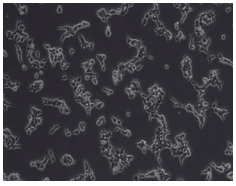
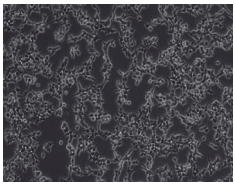
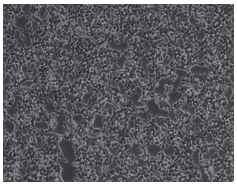
10%融合度		30%融合度	
50%融合度		80%融合度	

图6. 293T细胞在不同融合度的明视野效果（放大倍数：100×）

实验体系的放大和正式实验

根据预实验结果，放大慢病毒颗粒细胞感染实验，实施正式实验

通过慢病毒颗粒感染细胞的预实验，我们大致获得慢病毒颗粒感染目的细胞的优化条件。正式实验所用的细胞数往往比预实验多，慢病毒颗粒用量也需要适当放大。放大原则是保持细胞密度一致，按实际细胞数与预实验细胞数的比例放大培养液体积和慢病毒颗粒用量。有两种放大方法可供参考：

按底面积放大（适用于贴壁细胞）

当细胞的密度不变时，细胞总数和底面积成正比，且MOI不变，所需慢病毒颗粒用量也和底面积成正比。假设预实验使用96孔板（底面积0.3 cm2），使用1 μL慢病毒颗粒（滴度1×10^8 TU/mL）可成功感染细胞；如正式实验使用6孔板（底面积10 cm^2），则：

底面积的放大倍数 ≈ 33
正式的慢病毒颗粒用量 = 预实验用量×33 = 33 μL慢病毒颗粒（滴度1×10^8 TU/mL）

注：请确保细胞均匀、单层分布，不成簇生长。

按培养体积放大（适用于悬浮细胞）

当细胞的密度不变时，细胞总数和感染体积成正比，且MOI不变，所需慢病毒颗粒用量也和培养液体积成正比。假设预实验使用96孔板（培养体积100 μL），使用1 μL慢病毒（滴度1×10^8 TU/mL）可成功感染细胞；如正式实验使用6孔板（培养体积2 mL），则：

培养体积的放大倍数 = 20
正式的慢病毒颗粒用量 = 预实验用量×20 = 20 μL慢病毒颗粒（滴度1×10^8 TU/mL）

注：请确保细胞生长状态良好。

Tel: 4006-020-200 Email: sales@igenebio.com Web: www.igenebio.com

常见问题(FAQs)：

怎样购买份量合适数量的慢病毒颗粒?

一套完整实验所需的慢病毒颗粒包括：1.含有目的基因的慢病毒颗粒，2.阴性对照慢病毒颗粒，3.用于预实验的阳性对照慢病毒颗粒。

参考本手册第4-5页，您可以根据目的细胞特性、检测方法、培养器皿估算慢病毒颗粒的最佳用量，避免剩余的大量慢病毒颗粒超出最佳保存期；此外，GeneCopoeia™同时提供高滴度低价格的阳性对照慢病毒颗粒，帮助您以较低的预算和较充足的材料完成预实验的条件探索。初次使用慢病毒颗粒的研究者也可使用阳性对照慢病毒颗粒熟悉实验过程。如对慢病毒颗粒用量的估算有疑惑，欢迎致电，我们将为您推荐合适的购买量。(联系电话：4006-020-200)

CeneCopoeia™提供的慢病毒颗粒可以用于动物体内（*In vivo*）实验吗?

GeneCopoeia™提供的即用型慢病毒颗粒全部经过纯化、浓缩处理，去除了细胞碎片等杂质，进一步降低免疫原性，适用于各类活体动物注射实验和成瘤实验。

什么是第三代慢病毒包装系统？它与第二代包装系统的区别是?

通常，慢病毒颗粒包装系统包含慢病毒表达载体质粒和包装质粒。在第二代和第三代包装系统中，编码基因表达载体、包膜和包装所需蛋白的基因被设计分配到不同质粒，从而大大地降低了慢病毒自发重组的危险性。在第二代系统，一些慢病毒结构蛋白会伴随目的基因的表达而表达，而第三代系统的载体被修改为自体失活、不依赖于Tat蛋白。GeneCopoeia™的HIV慢病毒表达系统是第三代慢病毒载体系统的优化版，优化慢病毒颗粒滴度，同时加强了生物安全性。

慢病毒颗粒对目的细胞的感染效率很低，如何提高感染效率?

提高感染效率的前提是保证细胞生长状态良好。其次，可以通过提高 MOI 值来提高感染效率，也可以在培养基中加入Polybrene (4-10 μg/mL)提高感染效率。

添加慢病毒颗粒后，细胞为什么大量死亡?

慢病毒颗粒对靶细胞有一定毒性。添加量过多、感染时间过长都可能对目的细胞造成伤害。如遇上这种情况，建议您降低MOI值，并在感染细胞4-8小时后进行换液（以新鲜的全培养基替换含慢病毒颗粒的旧培养基），最长换液时间不可大于12小时。

常见问题(FAQs)：

Polybrene是什么？在慢病毒颗粒感染中，Polybrene添加越多越好吗？

Polybrene是常用的感染添加剂，通常的使用浓度为4-10 μg/mL，Polybrene 能显著提高慢病毒的感染效率，通常能提高感染效率2-10倍，对部分细胞甚至可提高感染效率10-20倍。当目的细胞MOI高于20时，我们建议在培养基中加入Ploybrene(约4-10 μg/mL)适当提高感染效率。

然而，Polybrene有一定的细胞毒性，不同细胞对Polybrene的敏感度和耐受性不同，部分细胞对Polybrene反应明显，容易导致细胞状态变差、形态发生变化、甚至死亡，因此并非每种细胞都适合添加Polybrene。

在正式使用Polybrene前，建议在1-10 μg/mL范围内设置梯度，观察细胞在该浓度下，24小时后是否仍保持健康生长，从而确定该细胞的最适Polybrene浓度。

目的细胞可以被慢病毒颗粒感染，但eGFP的荧光强度很低，为什么？

在目的细胞被慢病毒颗粒感染过程中，eGFP荧光强度取决于病毒感染细胞内的慢病毒颗粒数、细胞本身的状态、细胞类型以及观察时间等。一般情况下，目的细胞感染慢病毒颗粒数越多，细胞增殖越快，eGFP 荧光会较强。慢病毒携带基因表达时间较长，一般在增殖较快的细胞中也需要感染72-96小时才会到达eGFP的表达高峰。对于增殖较慢的细胞，感染时间则需更长。建议如果您的细胞在感染后观察的荧光强度较低，建议继续培养一段时间再观察。

进行慢病毒颗粒感染后，为什么目的细胞用qPCR检测不到目的基因表达量的变化？

如果使用的检测方法是qPCR，原因可能是目的基因含特殊序列结构、或与目的细胞系统不能兼容的问题，导致转录受影响，建议同时培养、感染目的细胞和293T工具细胞，同时进行检测，如目的基因在293T细胞转录不受影响，则可能为目的基因与目的细胞的相互作用导致转录受阻。

慢病毒颗粒在储存期间不慎染菌，还可以继续使用吗？

如慢病毒颗粒不慎染菌，且实验材料有限，可以使用0.45 μm滤膜对慢病毒进行滤菌操作。当然，该操作会导致一定程度的滴度损失及慢病毒颗粒总量损失。如条件允许，我们建议重新购买该种慢病毒。

附：慢病毒滴度的复核

以逐孔稀释法测定滴度

1. 测定前一天，将H1299细胞铺板（此处使用96孔板），每个孔加1×10^4个细胞，体积为100 μL。
2. 根据慢病毒颗粒的预期滴度，准备7~12个无菌的EP管。在每个管中加入90 μL培养基。
3. 取待测定的慢病毒颗粒原液10 μL加入第1个EP管，混匀后，取10 μL加入到第2个EP管；继续相同的操作，直到最后1管。
4. 选取相应的细胞孔，去掉90 μL培养基。再加入稀释好的慢病毒颗粒溶液。放入培养箱培养。
5. 16小时后，去旧培养液，加入完全培养液100 μL。
6. 3天后，观察荧光表达情况。选取荧光数最少的两个细胞孔，统计荧光细胞的个数或以FACS进行细胞计数。在进行荧光拍摄时，必须选取荧光分布均匀的视野。

如慢病毒载体不带荧光标记，可在感染后72小时加入抗性筛选药物（必须对应载体的抗性筛选标记），继续培养（培养时间可参考第8页表4），观察细胞生长状况，计算具有抗性的细胞数目。

计算示例（请参看第18页图7）：

选取E组、F组图片用于计算滴度，E组荧光数为11，F组荧光数为5。

E组滴度 = 荧光数×稀释倍数×1000 = 11×10^4×1000 = 1.1×10^8 TU/mL
F组滴度 = 荧光数×稀释倍数×1000 = 5×10^5×1000 = 5×10^8 TU/mL
最终滴度=（E组滴度 + F组滴度）÷2 = (1.1×10^8 + 5×10^8)÷2 ≈ 3×10^8 TU/mL

稀释说明（可参考图7的效果示例）：

第1个EP管中加入10uL病毒原液，标记为1^1 μL；
第2个EP管中进行了第1次十倍稀释，所得病毒原液为第1个EP管中的1/10，标记为1^0 μL；
第3个EP管中进行了第2次十倍稀释，所得病毒原液为第2个EP管中的1/10，标记 为1^{-1} μL；

依此类推

第7个EP管中进行了第6次十倍稀释，所得病毒原液为第6个EP管中的1/10，标记 为1^{-5} μL。

用于滴度复核的荧光拍摄图片：（仅供参考）

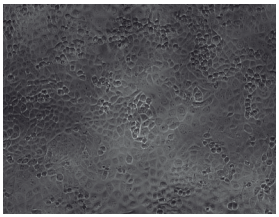
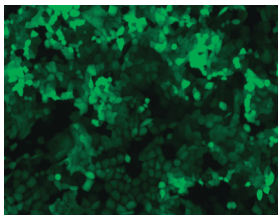
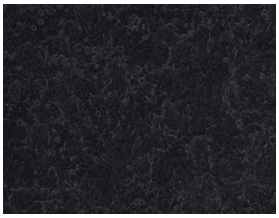
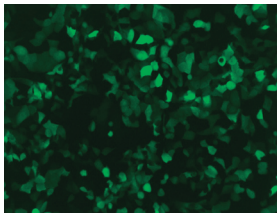
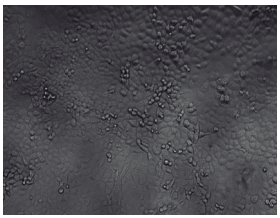
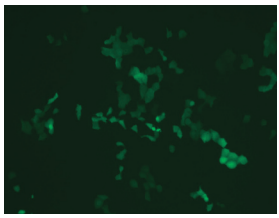
样品组	明视野100×	荧光视野100×
A组 1^{0} μL		
B组 1^{-1} μL		
C组 1^{-2} μL		

图7. H1299细胞以逐孔稀释法测定慢病毒滴度（上）

Tel: 4006-020-200 Email: sales@igenebio.com Web: www.igenebio.com

用于滴度复核的荧光拍摄图片：（仅供参考）

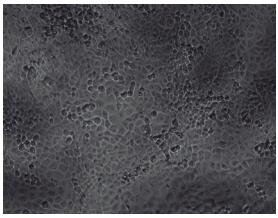
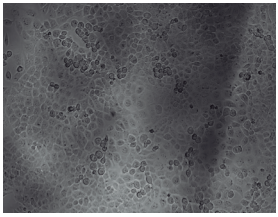
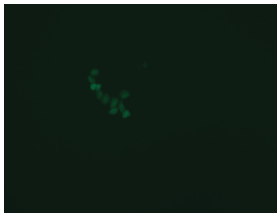
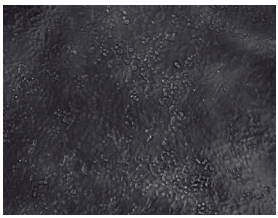
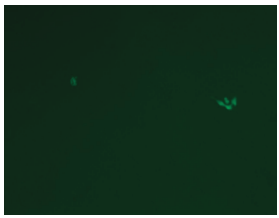
样品组	明视野100×	荧光视野100×
D组 1^{-3} μL		
选取 E组 1^{-4} μL		
选取 F组 1^{-5} μL		

图7. H1299细胞以逐孔稀释法测定慢病毒滴度（下）

附：细胞MOI值参考列表

由于不同细胞的代数、状态等因素有差异，因此MOI值也存在一定差异，以下数据仅供参考。

表6. 部分细胞的MOI值参考列表

物种	细胞名称	细胞中文名	MOI
人	A431	人皮肤鳞癌细胞	5
人	A549	人非小细胞肺癌细胞	5
人	Astrocytes	人星形胶质细胞	1
小鼠	B16-F10	小鼠皮肤黑色素瘤细胞	5
人	BMM	人骨髓来源巨噬细胞	8
人	BxPC-3	人原位胰腺腺癌细胞	10
人	H3255	人肺癌细胞	10
人	HCT116	人结肠癌细胞	5
人	HeLa	人宫颈癌细胞	3
人	HEK293T	人胚肾上皮细胞	5
小鼠	Hepa1-6	小鼠肝癌细胞	3
人	HMVEC	人微血管内皮细胞	100
人	HT-29	人结肠癌细胞	3
人	HUVEC	人脐静脉上皮细胞	100
人	Jurkat	人急性T淋巴细胞白血病细胞	10
小鼠	LLC-1	小鼠Lewis肺癌细胞	6
人	LNCaP	人前列腺癌细胞	5
人	MM200	人黑色素瘤细胞	5
人	MCF-7	人乳腺癌细胞	2
人	MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	1
人	MM-AN	人转移性黑色素瘤细胞	16
小鼠	MMC	小鼠乳腺癌细胞	4
人	MRC-5	人胚肺细胞	1
人	NB4	人白血病细胞	10
大鼠	PC12	大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞	20
人	SKOV-3	人卵巢癌细胞	15
人	U-2OS	人骨肉瘤细胞	5

广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路3号广州国际企业孵化器F区8楼
邮编：510663

电话：4006-020-200
020-28069288
020-28069233

邮箱：sales@igenebio.com
网址（English）： www.genecopoeia.com
网址（Chinese）： www.igenebio.com

易锦生物
iGeneBio