



西安基恩科生物科技有限公司

慢病毒产品使用手册



创新基因递送 服务人类健康

Innovative Gene Delivery For Human Health

前言

西安基恩科生物科技有限公司位于西安市高新区，是一家专业从事基因编辑、基因修饰技术产品研发和基因治疗的高科技生物技术有限公司。基恩科生物致力于为全国生物科技工作者提供安全、高效的基因技术产品，包括各种基因敲除细胞系、基因过表达细胞系和基因融合表达细胞系，以及各种慢病毒介导的基因转导技术服务、基因编辑技术的基因遗传修饰服务。

公司有三大技术平台，慢病毒包装技术平台、基因过表达细胞系构建平台、基于CRISPR/Cas9的基因编辑技术平台，可针对不同物种、不同种类细胞进行细胞进行基因敲除、基因突变、基因过表达、外源基因插入以及目的基因荧光标记技术服务。公司拥有专业的技术研发团队，多年基因技术研发经验，先进的实验室和实验设备，包括GMP万级细胞培养室、基因工程实验室、微生物实验室、为稳定高效的基因工程产品提供有力的支撑；公司以不断的技术创新为驱动力，竭力为客户提供最优质的产品和服务，努力成为世界一流的生物科技企业。

本文主要介绍基恩科 (Genecarer) 生物旗下慢病毒产品的使用、操作要点以及注意事项等，对初学者快速掌握实验有很大帮助，若您在实验过程中还有其他问题，可拨打我们的技术电话 (029-84613682) 或关注微信公众号二维码私信我们。



目 录

一、慢病毒介绍 01

二、慢病毒使用安全注意事项 01

三、慢病毒的储存及稀释 02

四、慢病毒感染预实验 02

1. 确定抗生素筛选的使用浓度 02

2. 确定 MOI 值 03

3. 辅助试剂的选择 06

五、慢病毒感染实验 07

1. 感染贴壁细胞 07

2. 感染悬浮细胞 09

六、细胞感染常见问题 09



01 慢病毒介绍

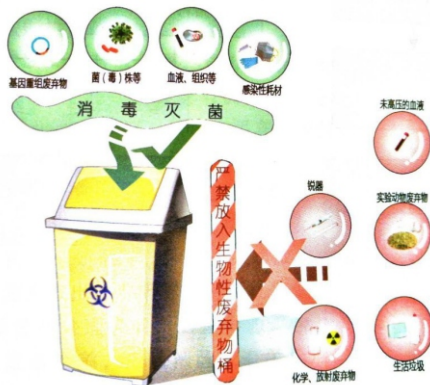
重组慢病毒载体是一种强大而有效的工具，可以将遗传物质转移到大部分细胞（如分裂细胞、干细胞、原代细胞等）的基因组中并维持表达，具有感染谱广泛、可以有效感染分裂细胞和非分裂细胞、长期稳定表达外源基因等优点。

02 慢病毒使用安全注意事项

基恩科提供的慢病毒颗粒中的毒性基因已被删除，属于假型病毒，但该病毒仍具有潜在的危害，强烈建议不使用能够表达已知的癌症的假型慢病毒，使用慢病毒载体前必须充分了解其潜在危害和必要的预防措施。

慢病毒为HIV-1假型病毒，HIV属于生物安全级别2的病毒种类，对人体的危害不言而喻。慢病毒载体删除了HIV-1的编码基因，在介导目的基因的表达时，没有任何的HIV-1蛋白的表达。虽然慢病毒载体在世界上各个实验中被广泛应用，没有报道有任何不良事件，但仍具有潜在的产生复制性慢病毒（RCL）和致癌风险，操作者在实验中仍需要保持高度警惕，所有操作均应按照以下指导执行：

- 1.所有操作应在 BSL2 级生物安全柜中进行,如在超净台请关闭风机。
- 2.所有操作人员需要穿实验服、佩戴一次性口罩和手套，避免病毒接触口、眼、鼻、耳、伤口等身体开放性区域。
- 3.最大限度减少液体飞溅及气溶胶的产生。实验结束后需要使用1%SDS溶液擦拭干净生物安全柜台面。
- 4.如需要离心，应注意使用严密封口的离心管或使用封口膜严密封口后再离心，防止带有病毒颗粒的液体污染离心机及实验室其他地方。
- 5.高度注意被污染的尖锐物品，如刀片、注射器、针头、玻片、移液管、毛细玻璃管等。
- 6.所有接触过病毒的器具，需要经过消毒液浸泡24h以上或高温高压消毒才可进行下一步处理。
- 7.实验结束后，实验人员需使用肥皂及清水标准洗手法清洗双手。



03 慢病毒的储存及稀释

慢病毒对极端温差敏感。反复冻融和长期暴露于环境温度将降低功能性慢病毒滴度。基恩科提供的慢病毒为50-100 μL /管，一般不需要分装。如果有分装的需要，收到病毒后立刻于冰上使用预冷的离心管分装病毒（此时可以留存大于35 μL 用于病毒感染前的MOI预实验）。分装后病毒应存储于-80℃冰箱中。慢病毒颗粒于-80℃可储存12个月，-20℃储存2个月，4℃储存一周。根据基恩科的实验结果显示，在储存期限内，储存于-20℃的慢病毒未显示出明显的滴度降低现象，但仍然强烈建议用户将慢病毒储存于-80℃中。

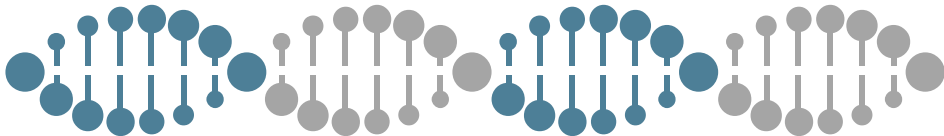
根据实验需要，可使用预冷的完全培养基或 PBS 稀释慢病毒颗粒，稀释前于冰上解冻，并且实验全程请将病毒颗粒置于冰上，避免过长时间暴露于环境温度中；本公司使用配置的病毒冻存液保存病毒，因此稀释后的慢病毒请立即使用，不建议再次冻存。

04 慢病毒感染预实验

1. 确定抗生素筛选的使用浓度

根据实验目的及实验需要，如需要对感染病毒的细胞进行筛选，需要确定该细胞适用的抗生素浓度。常用的真核抗性有：嘌呤霉素、潮霉素B、杀稻瘟菌素及遗传霉素。下表为常用的真核抗性及其筛选周期及一般工作浓度。

真核抗性	筛选周期	工作浓度
Puromycin	1-4 days	1- 10 $\mu\text{g/mL}$
Hygromycin B	5-7 days	50-500 $\mu\text{g/mL}$
Blasticidin	Within 1 week	2- 10 $\mu\text{g/mL}$
G418	7- 14 days	100-800 $\mu\text{g/mL}$



- a) Day0: 将细胞铺至24孔板, 根据不同细胞的生长速度, 控制细胞接种量使得次日细胞密度达到 80%左右。
- b) Day1: 加入不同浓度的抗生素 (此处以嘌呤霉素为例) :

0 µg/mL	0.5 µg/mL	1 µg/mL	1.5 µg/mL	2 µg/mL	2.5 µg/mL
3 µg/mL	3.5 µg/mL	4 µg/mL	4.5 µg/mL	5 µg/mL	5.5 µg/mL
6 µg/mL	6.5 µg/mL	7 µg/mL	7.5 µg/mL	8 µg/mL	8.5 µg/mL
9 µg/mL	9.5 µg/mL	10 µg/mL			

- c) Day3:加入抗生素48h后, 显微镜观察细胞状态: 将全部细胞杀死的最低浓度即为该细胞适用的抗生素工作浓度。
- 注意事项1: 抗生素筛选时建议每天更换新的培养基并加入抗生素。
- 注意事项2: 抗生素筛选时严格控制细胞密度, 细胞汇合度不能超过100%。

2. 确定 MOI值

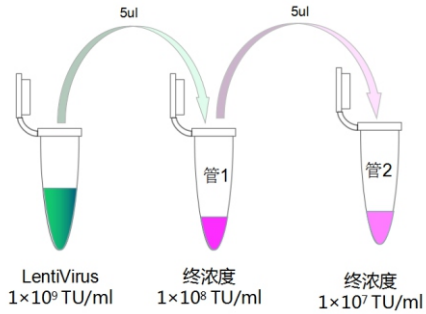
MOI是Multiplicity of Infection的缩写, 中文为感染复数或复感染指数, 其含义是 感染时病毒与细胞数量的比值, 即平均感染每个细胞病毒活性单位数 (TU number/cell)。MOI取决于多种因素, 如细胞种类、细胞状态、目的基因大小等。

因此, 实验前需了解慢病毒对靶细胞的亲嗜性、感染效率、MOI范围等, 可以通过查阅文献或预实验摸索合适的 MOI值。实际上, 由于不同的细胞来源、细胞代数、细胞状态、目的基因等差异因素, 实际的MOI也会与文献有差异。所以在正式实验前进行慢病毒感染靶细胞的最佳MOI及感染条件摸索是很必要的。一般, 慢病毒感染某种细胞的感染效率达到80%时的MOI值视为最佳MOI 值。

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

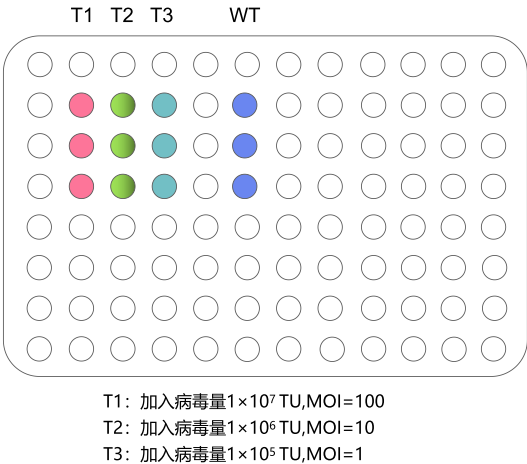
- a) 感染前 24h: 用胰酶消化目的细胞并计数, 调整细胞浓度为 3~5 × 10⁴ cells/ml 接种到96 孔板, 不少于 12 个孔, 培养基体积为 100ul。病毒感染时的细胞汇合度 30~50%。

- b) MOI 值的设置若有文献参考, 可以参考值为中心设置梯度覆盖参考值; 若无文献参考可按 10 倍稀释设置为 100、10、1, 每个梯度 3 次重复。



c) 感染当天：准备2个无菌的1.5 mL 离心管，分别加入45 μ LDMEM。吸取5 μ L的 1×10^9 TU/ml的病毒(预先从-80℃取出在冰上融化)加入到第一个管中，轻柔混匀，不要产生过多气泡；再从从第一管中吸取5 μ L混匀后的病毒到第二个管中，同样混匀。于是第1个管中的病毒滴度为 1×10^8 TU/ml，而第2个管中的滴度为 1×10^7 TU/ml。

d) 取10 μ L 1×10^9 TU/ml的病毒(预先从-80℃取出在冰上融化)加入第一组的相应孔中；取10 μ L上一步骤制备的两个不同浓度病毒稀释液加到各组的相应孔中；由此，三组加入的病毒量分别为 1×10^7 TU， 1×10^6 TU， 1×10^5 TU，而细胞经过生长，此时细胞数目约 1×10^5 ，所以三个孔的 MOI 分别为 100、10、1。



e) 在水平方向轻轻拍打培养板，使培养基和病毒等试剂充分混匀，然后把细胞板放回培养箱孵育。

f) 感染72小时后，观察荧光表达情况，通过荧光率，确认病毒感染目的细胞的最佳MOI 值，同时对感染难易程度及感染时间作出判断。一般选择感染效率为80%且细胞状况良好的 MOI 为该细胞的适用 MOI。

g) 对于生长缓慢代谢慢的细胞，可以适当延长观察时间，中途可以换液，保持细胞的活性。以下为部分常见细胞系 MOI数值，数据来源文献。由于不同实验室细胞状态均不相同，MOI 值存在一定差异，以下数据仅供参考。

常见细胞MOI及感染条件

细胞系	细胞名称	MOI值范围	puro筛选浓度	Blast筛选浓度
293T	人胚肾上皮细胞	1-3	2μg/ mL	6μg/ mL
HEK-293	人胚肾上皮细胞	1-3		
H1299	人非小细胞性肺癌细	1-3		
95D	人肺巨细胞癌	1-3		
Panc- 1	人胰腺癌细胞	2-5		
PKO	人结肠癌细胞	2-5		
SK-OV-3	人卵巢癌细胞株	2-5		
B-CPAP	人甲状腺乳头状癌细胞	10	2μg/ mL	
HT29	人结肠癌细胞	10	6μg/ mL	
U251	人脑胶质母细胞瘤	1-3		
U87 MQ	人脑星型胶质母细胞	1-3		
HK-2	人肾皮质近曲小管上皮细胞	5- 10	2μg/ mL	
HepG2	人肝癌细胞	30	2μg/ mL	6μg/ mL
Hepa1-6	小鼠肝癌细胞	30	2μg/ mL	8μg/ mL
SMMC-7721	人肝癌细胞	30		
Huh-7	人肝癌细胞系	30		
Hela	人宫颈癌细胞株	20	2μg/ mL	

Siha	人子宫颈鳞癌细胞	20	1.5µg/mL	
SW480	人结肠癌细胞株	20–30	2µg/ mL	
A7R5	大鼠胸大动脉平滑肌细胞	20–30	2.5µg/mL	10µg/ mL
Hacat	人永生化表皮细胞	20	2µg/ mL	
4T1	小鼠乳腺癌细胞	20–30	4µg/ mL	
K562	人白血病细胞	40		
MDA–MB–231	人乳腺癌细胞	30		
MDCK	犬肾细胞	10	2µg/ mL	
NIH–3T3	小鼠成纤维细胞系	40	4µg/ mL	
Raw264.7	小鼠单核巨噬细胞	30		
HOS	人骨肉瘤细胞	30	2µg/ mL	
MCF7	人乳腺癌细胞	20–30	1µg/ mL	
AGS	人胃癌细胞	100– 150		
BGC–823	人胃癌细胞	100– 150		

《常见细胞MOI及感染条件》是根据基恩科生物在进行基因修饰项目中积累的MOI值和 Puromycin浓度，表中暂无的细胞可根据荧光对照病毒梯度稀释后感染目的细胞或文献报道进行筛选。

3. 辅助试剂的选择

Polybrene可以促进病毒对细胞的侵染，但在少数情况下它对细胞有伤害。有的细胞对Polybrene的毒理反应明显，因此细胞感染时是否适合Polybrene需要摸索；不同细胞对Polybrene的敏感度不同，可以用1 ~ 10 µg/ml的范围筛选合适的浓度，以24h内细胞无明显毒性反应为佳，过长时间暴露于Polybrene可对某些细胞产生毒性作用。可参考文献并进行预实 验摸索，Polybrene最常用的工作浓度为6 ~ 8 µg/ml。一般我们推荐使用浓度为8 µg/ml。如果细胞 MOI 值比较低或者对感染效率要求不高，建议不加任何感染辅助试剂。

05 慢病毒感染实验

1. 感染贴壁细胞

- a) 将对数生长期的状态良好的细胞接种至所需培养器皿中，控制细胞接种量使得次日病毒 感染时细胞汇合度 30–50%。如果细胞增殖较快，建议接种细胞密度为 30%，如果细胞增殖较慢，建议适当增加接种汇合度，以病毒感染 72h 细胞汇合度未超过 100%为标准。
- b) 感染当天，取出细胞，更换为含有合适浓度（一般为8 µg/ml）Polybrene 的新鲜完全培养基。
- c) 取出病毒于冰上解冻。根据 MOI 及病毒滴度加入相应的病毒量，可先用完全培养基稀释。加入病毒后轻柔“8”字混匀。当培养器皿底面积较大时，为增加病毒与细胞接触的几率，感染时可适量减少培养基体积。下表为不同细胞培养体系推荐的感染体积及病毒用量（病毒滴度为 1×10^8 TU/mL）。

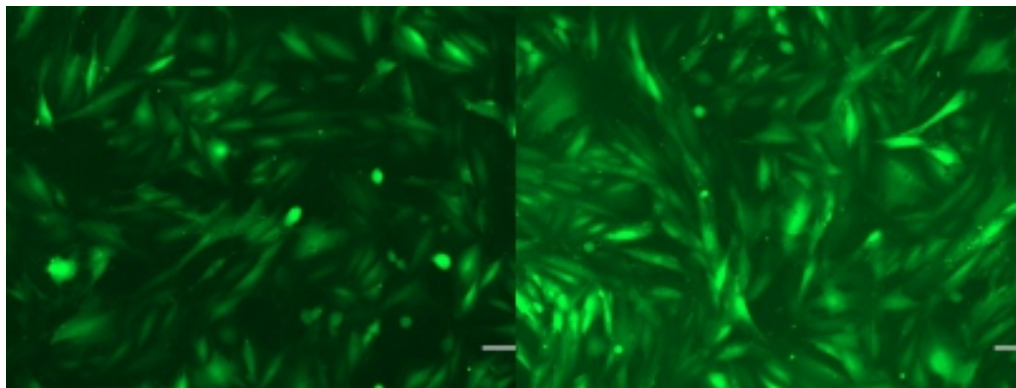
耗材名称	最大生长面积	接种细胞量	推荐培养基用量	感染时体积	MOI=1	MOI=10	MOI=100
35mm 皿	8cm ²	2×10 ⁵	2 mL	1 mL	4 µL	40 µL	400 µL
60mm 皿	21cm ²	5×10 ⁵	4 mL	2 mL	10 µL	100 µL	1 mL
T25 瓶	25cm ²	5×10 ⁵	5 mL	2 mL	10 µL	100 µL	1 mL
6 孔板	9.5cm ²	2×10 ⁵	2 mL	1 mL	4 µL	40 µL	400 µL
12 孔板	3.8cm ²	8×10 ⁴	1 mL	500 µL	1.6 µL	16 µL	160 µL
24 孔板	1.9cm ²	5×10 ⁴	500 µL	500 µL	1 µL	10 µL	100 µL
48 孔板	0.95cm ²	2.5×10 ⁴	250 µL	250 µL	0.5 µL	5 µL	50 µL
96 孔板	0.32cm ²	0.8×10 ⁴	100 µL	100 µL	0.2 µL	2 µL	20 µL

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

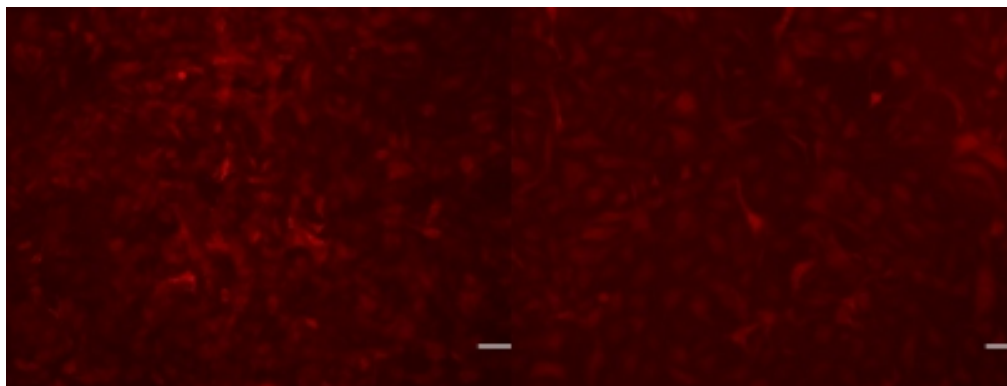
d) 37°C培养12–16h，更换为完全培养基，继续培养。如细胞状况发生明显变化，可于感染后8h换液，保证细胞的正常生长。

e) 继续培养。期间观察细胞，若液体变黄，可对细胞换液维持细胞活性。

f) 感染后72h（一般代谢较旺盛的细胞或慢病毒包装容量48h即可观察到荧光，代谢较慢的细胞可能需要96h甚至更长时间才能观察到荧光），观察感染效率。如果需要筛选稳定细胞株，可以根据预实验选用合适的抗生素及合适的工作浓度进行筛选。



A7R5 MOI=30 EGFP



A549 MOI=1 RFP

2. 感染悬浮细胞

- 感染当天，将对数生长期的状态良好的悬浮细胞收集，根据需要的细胞量分装于1.5mL离心管中并离心收集。
- 用100–200 μ L含有合适浓度（一般为8 μ g/ml）Polybrene的无血清培养基重悬细胞沉淀。
- 取出病毒于冰上解冻。根据MOI及病毒滴度加入相应的病毒量，可先用无血清培养基稀释；若需要稀释病毒，则上一步重悬细胞沉淀时需要考虑稀释病毒的体积。
- 加入病毒后轻柔吹打混匀。将1.5mL离心管放于37℃培养箱中孵育30min。
- 将管中混合液吸出加到培养器皿中，加入足量新鲜的完全培养基。
- 感染后12h更换培养基。
- 感染72–96h后观察细胞阳性率。

注：以上为病毒感染悬浮细胞的一般方法，但悬浮细胞较贴壁细胞更难感染，因此如有必要，可采用离心感染方法提高感染效率。将细胞接种至培养器皿中，加入适量的病毒后，将培养器皿密封，用平角转子离心机1000g离心1h，再放回培养箱正常培养。

06 细胞感染常见问题

1. 如何提高感染效率？

通过提高MOI值来提高慢病毒的转染效率，也可以通过适当提高转染辅助试剂（如Polybrene）的工作浓度来提高病毒的转染效率。当采取以上方法时，需观察细胞状态，一旦细胞状态变差，需要更换为新鲜的完全培养基继续培养。一般来讲，状态良好的细胞也可以获得较状态差的细胞更高的转染效率。

2. 慢病毒感染后，一般多长时间观察转染效率

一般来讲，对于代谢较快的细胞，如293T细胞，病毒感染后48–72h目的基因的表达量达到高峰；对于代谢较慢的细胞，如原代细胞、神经细胞等，病毒感染后需要96h甚至更长时间目的基因的表达量才能达到高峰。

3. 加入病毒后，细胞死亡很多，如何处理？

若病毒感染后，细胞死亡很多，首先考虑慢病毒对该细胞毒性较大，请调整并减少病毒用量，并在感染后4–8h及时对细胞进行换液。



合成和载体定制服务



服务名称	周 期	服务内容
siRNA合成	5-7d	合成一条双链siRNA，沉默靶基因
siRNA合成（三保一）	5-7d	合成三条双链siRNA，沉默靶基因
microRNA mimic	5-7d	双链，合成miRNA模拟物，过表达miRNA，用于细胞实验
microRNA inhibitor	5-7d	单链，合成miRNA抑制物，抑制miRNA，用于细胞实验
microRNA agomir	10-15d	双链，合成化学修饰的miRNA激动剂，用于细胞和动物实验
microRNA antagomir	10-15d	单链，合成化学修饰的miRNA拮抗剂，用于细胞和动物实验
化学修饰ASO	5-7d	单链寡核苷酸，与目的RNA结合，主要用于细胞核RNA沉默
sgRNA合成或体外转录	2-3w	sgRNA体外合成，用于引导CRISPR/Cas系统对目的基因组或RNA切割
cDNA克隆（≤1.8Kb）	1-2w	获取目的片段，并克隆到目标载体上
cDNA克隆（2-5kb）	2-3w	获取目的片段，并克隆到目标载体上
cDNA克隆（5-8kb）	4-6w	获取目的片段，并克隆到目标载体上
病毒表达载体构建cDNA克隆（≤1.8Kb）	1-2w	获取目的片段，并克隆到慢病毒、腺相关病毒、腺病毒等载体上
病毒表达载体构建（1.8-4.5kb）	3-4w	获取目的片段，并克隆到慢病毒、腺相关病毒、腺病毒等载体上
组织特异性表达载体构建	2-3w	通过组织特异性启动子，实现目的基因特定组织表达（通常为AAV载体，并配合AAV血清型）
组织特异性干扰载体构建	2-3w	通过组织特异性启动子，实现特定组织的基因被沉默
诱导型表达载体构建	2-3w	通过tet诱导型启动子，实现目的基因诱导表达或沉默
转座子表达载体构建	2-3w	构建转座子表达载体，实现目的基因稳定整合基因组



合成和载体定制服务



服务名称	周 期	服务内容
基因截断载体构建	1-2w	根据蛋白结构域或功能结构域对目的基因进行截断表达
miRNA表达载体构建	1-2w	获取目的片段，并克隆到目标载体上
miRNA Sponge载体构建	1-2w	表达miRNA Sponge载体序列
miRNA结合位点-双荧光素载体构建	1-2w	miRNA结合位点附近300-500bp的片段构建到pmirGLO或psicheck2载体
miRNA结合位点突变-双荧光素载体构建	1-2w	miRNA “Seed” 结合位点突变后构建到pmirGLO或psicheck2载体
启动子-luciferase载体构建	2-3周	启动子序列预测，构建在pGL4.10-luciferase载体
Car载体构建	2-3周	用于Car-T/Car-NK等慢病毒包装用表达载体载体构建
mRNA-IVT体外转录载体构建	2-3周	构建体外转录载体，含两端酶切位点，T7启动子，5UTR，3UTR，polyA等元件构建，用于体外转录及LNP包装
线粒体定位载体构建	2-3周	通过增加mito、Cox8等线粒体定外信号肽，构建线粒体定位表达载体
LncRNA表达载体构建	2-3w	获取目的片段，设计并克隆到目标载体上
CircRNA表达载体构建	2-3w	获取目的片段，设计并克隆到成环载体上，表达环状RNA
shRNA载体构建	1-2w	含三个靶向基因/非编码区的干扰质粒，赠送NC对照质粒
dual-shRNA载体构建	1-2w	含2个靶向基因/非编码区的序列串联载体，赠送NC对照质粒
CRISPR-Cas9 sgRNA 载体构建	1-2w	含三个靶向基因组DNA的gRNA质粒
CRISPR-Cas12a sgRNA载体构建	1-2w	含三个靶向基因组DNA的gRNA质粒
CRISPR-CasRx sgRNA载体构建	1-2w	含三个靶向RNA的gRNA质粒



合成和载体定制服务



服务名称	周 期	服务内容
CRISPR-Cas9 dual sgRNA 载体构建	3-4w	含2个靶向基因的双gRNA质粒
CRISPR-Cas9 Tri-sgRNA 载体构建	3-4w	含3个靶向目的基因的gRNA质粒
CRISPRa载体构建	1-2w	含三个靶向启动子区域的gRNA质粒
CRISPRi载体构建	1-2w	含三个靶向启动子区域的gRNA质粒
enCRISPRa载体构建	1-2w	含三个靶向增强子区域的gRNA质粒
enCRISPRi载体构建	1-2w	含三个靶向增强子区域的gRNA质粒
基因敲入Donor载体构建	1-2w	基因敲入sgRNA和同源臂设计
Primer Editor pegRNA 载体构建	1-2w	pegRNA 序列设计和载体构建
PE3载体构建（一套）	2-3w	含一个pegRNA，2个sgRNA载体
TwinPE 载体构建	2-3w	含2个pegRNA
载体点突变（单点）	1-2w	对载体进行单碱基突变
载体点突变（多点 < 5）	2-3w	对载体进行多碱基突变（多点 < 5）
碱基缺失	1-2w	载体上删除部分碱基
碱基插入	1-2w	载体上插入部分碱基
无内毒素质粒中提	3-5d	质粒量 ≥ 35ug，浓度 ≥ 500ng/uL，用于细胞转染
无内毒素质粒大提	3-5d	质粒量 ≥ 500ug，浓度大于 ≥ 500ng/uL，用于细胞转染



扫码关注Genecarer微信公众号
更多资讯 更多技术

网址：www.genecarer.com

电话：029-84613682

地址：陕西省西安市高新区发展大道25号欧凯创业小镇315

