

特别说明：

慢病毒活性滴度： TU，即每毫升中含有的**具有生物活性**的病毒颗粒数。其他的 VG/mL，VP/mL 都是所有病毒颗粒数。

细胞经慢病毒感染后死亡或者用慢病毒感染后细胞出现小黑点：很有可能是，加入过量的慢病毒造成细胞**过感染**！建议先做预实验确定细胞的 MOI，根据病毒滴度准确计算病毒用量。越是浓缩纯化的病毒，越是需要精确计算病毒使用量，以避免感染不足或者过量感染，保证最好的细胞状态，以继续下游实验。

Q1：慢病毒感染细胞后什么时候基因表达达到峰值？-

慢病毒感染后在96小时左右达到基因表达峰值，对于生长缓慢的细胞还需要更久的时间。

Q2：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。

Q3：慢病毒如何稀释？-

使用时，先将其从-80℃冰箱取出，冰浴融化，可用PBS，生理盐水或培养基进行稀释。

Q4：Polybrene有什么作用？如何稀释？-

Polybrene是一种阳离子聚合物，可促进慢病毒外壳与细胞膜的相互作用，增加慢病毒对细胞的感染。用常规培养基将Polybrene稀释到需要的浓度，通常为共5-10μg/ml。如2μl Polybrene加入到998μl的常规培养基中，即可得到10μg/ml病毒稀释液（Polybrene原浓度为10mg/ml）。

Q4：细胞可以被慢病毒感染，但为何GFP荧光强度很弱？-

细胞中GFP荧光强度取决于病毒感染细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、细胞类型以及观察时间等。通常，目的细胞感染慢病毒颗粒数越多，细胞本身增殖越快，GFP荧光会较强。慢病毒在增殖较快的细胞中感染96-120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。

Q5：如何确定Puromycin使用终浓度预实验？-

- a) 状态良好的细胞，接种于24孔板，待细胞生长至70%-80%融合度；
- b) 加入Puromycin进行空细胞致死最低浓度筛选，浓度范围设置：1μg/ml、2.5μg/ml、5μg/ml、10μg/ml（终浓度）；
- c) 药物处理48h后细胞全部死亡的最低药物浓度，即为后续Puromycin抗性细胞的筛选浓度。

贴壁细胞感染预实验

1. 实验目的：确定慢病毒感染细胞MOI和最佳感染条件。

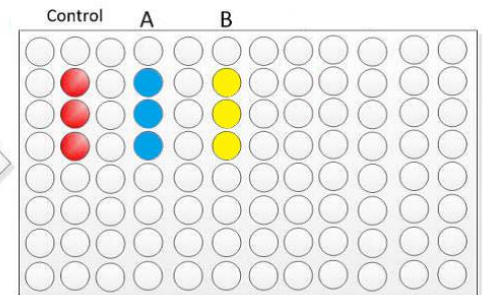
MOI: 通常某株细胞有80%被感染时所用的病毒颗粒数和细胞数目的比值作为该株细胞的MOI。 $MOI = (\text{病毒滴度} \times \text{病毒体积}) / \text{细胞数目}$

2. 实验步骤：

Day1: 接种细胞

用完全培养基制备2ml密度为 $3 \sim 5 \times 10^4$ 个/ml的细胞悬液，取100 μ l/孔加入96孔板中，共15个孔，其中3个孔作为Control组，继续培养。

$3 \sim 5 \times 10^4$ 个/ml
100 μ l/well

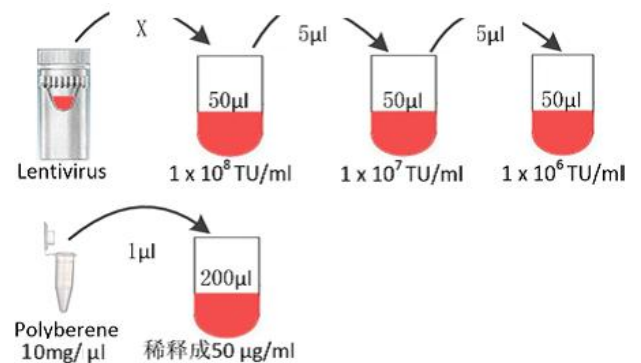


实验分组：

A组：常规培养基组，观察常规培养条件下病毒对细胞的感染效果；

B组：常规培养基+Polybrene组，观察Polybrene是否可以提升感染效果；

Control组：空白细胞组，观测实验过程中细胞生长是否正常。



Day2：感染

1. 将慢病毒依次稀释成3个梯度，各50 μ l：

I： 1×10^8 TU/ml

II： 1×10^7 TU/ml

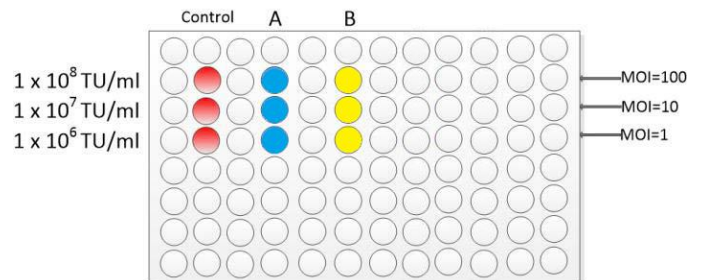
III： 1×10^6 TU/ml

2. 用常规培养基将Polybrene稀释成

50 μ g/ml，共200 μ l，标记为**P(M)**；

3. 吸掉上清液，并按照表1向各孔加样，混匀，继续培养；

感染后12h换回常规培养基，过程中观察细胞形态，发生变化时可以提前到8h换液，维持细胞正常生长。



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：效果确认

感染约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。

感染条件 病毒量	1E+8TU MOI=100	1E+7TU MOI=10	1E+6TU MOI=1
Control 组	培养基：100 μ l	培养基：100 μ l	培养基：100 μ l
A组	培养基：90 μ l Virus：10 μ l	培养基：90 μ l Virus：10 μ l	培养基：90 μ l Virus：10 μ l
B组	培养基：80 μ l P(M)：10 μ l Virus：10 μ l	培养基：80 μ l P(M)：10 μ l Virus：10 μ l	培养基：80 μ l P(M)：10 μ l Virus：10 μ l

表1.感染预实验中实验分组及感染条件

贴壁细胞正式感染实验

Day1：接种细胞

用完全培养基稀释细胞至 $3\sim 5 \times 10^4$ 个/ml，并根据表2接种相应的细胞数到培养板中。

Day2：感染

1. 依预实验结果，参考表2中更换相应培养基，如添加Polybrene，请保持终浓度 $5\mu\text{g/ml}$ 。

2. 依表3和预实验MOI，加入所需的病毒：

病毒体积 = (MOI x 细胞数目) / 病毒滴度

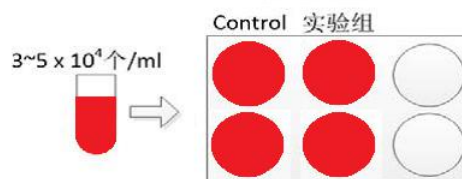
3. 按照预实验感染后换液时间，更换为常规培养基，继续培养。

Day3-4：继续培养

中间可对细胞换液，维持细胞活性。

Day5：观察感染效果

按照预实验确认的感染时间，观察感染效率，进行后续实验。



含 $5\mu\text{g/ml}$ Polybrene的感染液

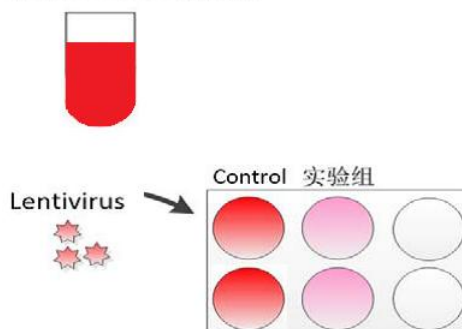


表2. 接种和病毒感染时感染液体积

类别	底面积	接种体积	换液体积
96孔板	0.3 cm ²	100 μl	100 μl
48孔板	0.6 cm ²	200 μl	200 μl
24孔板	2 cm ²	500 μl	500 μl
12孔板	4 cm ²	1 ml	500 μl
6孔板	10 cm ²	2 ml	1 ml
T25瓶	25 cm ²	5 ml	2.5 ml

悬浮细胞感染实验

预实验：

接种细胞：制备2ml细胞悬液。目的细胞收集后离心，弃清液，用完全培养基重悬稀释成 5×10^4 个/ml，细胞悬液 $80\mu\text{l}$ /孔加入96孔板。

慢病毒和Polybrene的稀释参见[贴壁细胞实验](#)。

2. 感染操作：

a) 按照表1换液，保留96孔培养板中液体，并按 $10\mu\text{l}$ /孔加入病毒；A组和B组分别按照

$10\mu\text{l}$ /孔加入常规培养基和P(M)。

b) 感染后8~12小时，向每孔中加入 $100\mu\text{l}$ 常规培养基，保持细胞正常生长（**请勿换液**，

以免损失细胞数量）。

后续实验参见贴壁细胞实验

正式实验： 1. 细胞接种：根据预实验结果，将 5×10^5 个/ml的细胞悬液接种培养板，如需添加Polybrene，请保持终浓度 $5\mu\text{g/ml}$ 。

2. **后续实验参见贴壁细胞实验**。

