

使用说明书:慢病毒体外应用

交付内容

下表为定制化慢病毒产品的交付内容。可在相应的COA (Certificate of analysis document) 文件查看病毒滴度。

产品类型	交付内容	产品规格	应用范围
小规格包装	定制病毒	浓缩病毒 (>10 ⁸ TU/ml, 10×25 μl, HBSS保存液)	体外培养细胞
	对照病毒	浓缩病毒 (>10 ⁸ TU/ml, 1×100 μl, HBSS保存液)	体外培养细胞
	Polybrene	5 mg/ml, 溶于无菌去离子水, 200 μl	—
中规格包装	定制病毒	浓缩病毒 (>10 ⁸ TU/ml, 10×100 μl, HBSS保存液)	体外培养细胞
	对照病毒	浓缩病毒 (>10 ⁸ TU/ml, 2×100 μl, HBSS保存液)	体外培养细胞
	Polybrene	5 mg/ml, 溶于无菌去离子水, 200 μl	—
大规格包装	定制病毒	浓缩病毒 (>10 ⁸ TU/ml, 10×100 μl, HBSS保存液)	体外培养细胞
	对照病毒	浓缩病毒 (>10 ⁸ TU/ml, 2×100 μl, HBSS保存液)	体外培养细胞
	Polybrene	5 mg/ml, 溶于无菌去离子水, 200 μl	—
中规格包装和超纯化	定制病毒	超纯化病毒 (>10 ⁹ TU/ml, 10×50 μl, HBSS保存液)	动物体内
	对照病毒	超纯化病毒 (>10 ⁹ TU/ml, 10×50 μl, HBSS保存液) (选购)	动物体内
	Polybrene	5 mg/ml, 溶于无菌去离子水, 200 μl	—
大规格包装和纯化	定制病毒	超纯化病毒 (>10 ⁹ TU/ml, 10×100 μl, HBSS保存液)	动物体内
	对照病毒	超纯化病毒 (>10 ⁹ TU/ml, 10×100 μl, HBSS保存液) (选购)	动物体内
	Polybrene	5 mg/ml, 溶于无菌去离子水, 200 μl	—

接收病毒后的处理

- 慢病毒产品使用干冰冷藏运输。收到慢病毒后,可直接放置-80°C冷冻保存至少6个月,也可放置-20°C冷冻保存一周。将Polybrene放置-20°C冷冻保存,也可放置4°C保存两周。
- 使用前,将病毒液放置冰上融解。实验过程中,亦需保持冰上放置。慢病毒在高温条件下失活较快。
- 若实际使用量较少,可将融解的慢病毒小量分装多管,再放置-80°C冷冻保存。但需要注意的是,每一次冻融都会导致滴度下降(约20%)。

注意:应避免反复冻融,以免造成滴度大幅降低。



安全须知

所有VectorBuilder的慢病毒载体均是自我失活型,这意味着被感染的细胞不能复制出新的病毒颗粒,这是由于病毒中的基因组缺失了所有病毒复制相关基因导致的。尽管如此,慢病毒本身具有转导人原代细胞的能力,理论上仍存在生物危险的风险。我们建议按照BSL-2规范 (Biosafety Level-2, 二级生物安全防护水平) 对慢病毒进行操作。所有的操作、储存以及生物废料的处理均需依照公开发布的和所处机构制定的规范条例。

靶细胞转导

建议使用表达绿色荧光蛋白的对照慢病毒来选出靶细胞的最佳感染复数 (MOI, multiplicity of infection)。MOI, 即每个细胞感染的病毒颗粒数。换言之, MOI=1即是指每个细胞的使用病毒量为1个转导单位 (TU, transducing unit)。

贴壁细胞转导实验方法

1. 转导前1天(第0天)

将一定数量的靶细胞接种至一个新的培养皿中(转导时靶细胞的融合度应为30%-50%)。放置于37°C、5% CO₂的二氧化碳培养箱中培养18-20小时。例如,当靶细胞为293T时,建议在6孔板中的接种量为 3×10^5 个/孔。

2. 转导当天(第1天)

- 在冰上融解冻结的病毒液。偶尔情况下,融解后的病毒液会呈现轻微浑浊,这是正常现象,不会影响正常使用。为了吸取到准确的病毒数量,请先轻柔吹打,混匀融解后的病毒颗粒,再取适量的病毒液至适量的培养基中,然后轻柔混匀(避免涡旋震荡)。为获得较好的转导效果,培养基用量尽可能少,以覆盖培养表面为宜。一般而言,用量为100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 。例如,使用6孔板进行转导,建议培养基用量为1 ml/孔(6孔板每孔的表面积约为10 cm^2)。

注意:对于容易感染的细胞,转导细胞的初始MOI可在1-10。对于较难感染的细胞,可能需要更高的MOI。

- 尽管对于大部分细胞,Polybrene不是必需的,但对于某些细胞而言,Polybrene能提高慢病毒转导效率。Polybrene是多聚阳离子,能通过中和电荷间的相互作用来增强假病毒衣壳和细胞膜的结合。但Polybrene对于某些细胞有毒性。如果使用Polybrene,则应选几个工作浓度(1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)测试Polybrene对靶细胞的毒性。一般情况下,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Polybrene适合较多细胞。

注意:过度暴露于Polybrene(大于12小时)会造成某些细胞中毒。

- 吸出原有培养基,然后向细胞中加入含有病毒的培养基。
- 轻柔地摇动培养板以使病毒液都能覆盖每一处细胞,然后放置于37°C、5% CO₂的二氧化碳培养箱中过夜培养。

注意:如果您担心细胞暴露在病毒液中太久可能会影响细胞状态,可以将转导时间缩短在6-8小时。

3. 第2天

换液。吸出含有病毒的培养基,加入新鲜的完全培养基,放置于37°C、5% CO₂的二氧化碳培养箱中过夜培养。

4. 第3天及之后

慢病毒载体携带的基因通常在转导第2天才开始表达。为了让基因产物在细胞中持续积累,或者出现细胞表型的变化,应继续培养转导后的细胞。

抗性筛选:若慢病毒载体携带抗性基因,则可用抗生素来富集有效转导的细胞。若转导效率较高,可不进行抗性筛选。若采用抗生素筛选,则应在第2天或者第3天向培养基中加入相应的抗生素。下表列出了4种常用抗生素对某些细胞的药筛浓度以及时间。但对于某些特殊细胞,建议预先进行药筛浓度的确认测试实验。为了获得较好的药筛结果,尤其是针对敏感型细胞,必须使用不同浓度的抗生素来测试野生型细胞,制作致死曲线,再选用一个合适的抗生素浓度(尽可能地筛除掉未有效转导的细胞,但又不会影响有效转导的细胞,过高浓度的抗生素即使对携带抗性基因的细胞也会造成一定的伤害)。抗生素一般只在转导后药筛阶段使用,一旦未有效转导的细胞被杀死,存活的细胞就含有整合进细胞基因组的慢病毒载体。抗性筛选实验还需要设置一孔不加病毒的细胞作为阴性对照,用来判断药筛结束的时间点。当对照细胞全部死亡时,药筛应结束。然而,少数情况下,在后期培养中,病毒载体携带的抗性基因可能会出现沉默现象。因此,需要延长药筛时间以进一步杀死基因沉默的细胞。

荧光蛋白基因表达:新陈代谢能力较强的细胞,如293T和BHK21,被感染24小时后即可表达荧光基因。但是,对于代谢慢的细胞,如原代细胞、NSC、MSC等,则需要更多的时间来表达荧光基因,因此感染72-96小时后才能观察到荧光。

注意:基因的插入会影响位于其下游的荧光蛋白等基因的表达。对照病毒,由于没有插入基因,荧光通常较强,而插入了较长基因之后,荧光的亮度会随着插入基因的长度及特殊结构的存在而减弱,尤其是出现高GC片段,由于影响了转录,荧光强度会大大降低。

推荐使用的抗生素浓度和药筛时间

抗生素名称	测试细胞	推荐工作浓度	推荐药筛时间
Puromycin	293T	1-2 µg/ml	3-5 days
Geneticin (G418)*	HT1080	500-1000 µg/ml	7-11 days
Hygromycin B	293T	100-200 µg/ml	5-7 days
Blasticidin**	293T	5-15 µg/ml	7-11 days

*G418应用于Neomycin抗性基因筛选。

** 传代细胞可加快Blasticidin筛选。

贴壁细胞成功转导实例

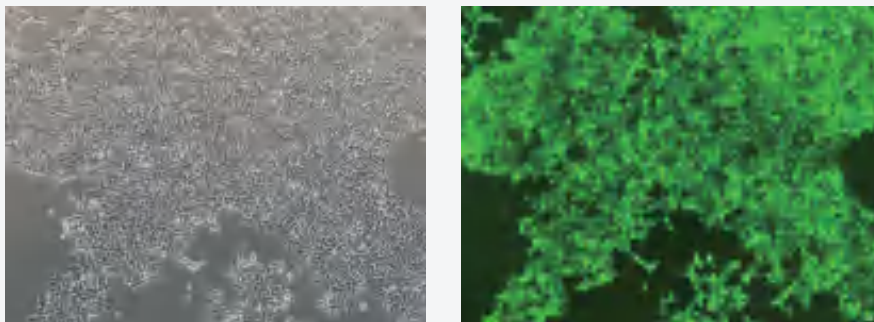


图1. 按照本文实验方法,使用表达绿色荧光蛋白的慢病毒以MOI=10转导293T细胞。100×参数下拍照。
左图:明视野;右图:绿色荧光。

悬浮细胞转导实验方法

细胞可通过直接向其中添加病毒来进行转导,或者使用一种离心感染的方法来进行转导,该法能将慢病毒转导效率增加5-10倍。通过一种未完全研究透彻的机制,将病毒与细胞的混合物进行离心可以极大增加病毒与细胞接触的几率,从而提升转导效率。我们建议在24孔板或者小体积中进行离心。在24孔板中操作流程为:

在1 ml完全培养基中,接种 5×10^5 个细胞/孔。

向培养基加入含有或者不含Polybrene的病毒。来回摇晃数次混匀。

密封培养板并放入酶标板转子中。

32°C, 1000 g离心1-2小时。

离心结束后,吸出含有病毒的培养基并加入1ml新鲜的完全生长培养基。

轻柔上下吹打以重悬细胞。

注意:细胞倾向于黏附在培养板的边缘。

在37°C孵育箱中复苏细胞至少6小时(或者过夜)。

如有需要,可将细胞转移到更大的培养板培养。

悬浮细胞成功转导实例

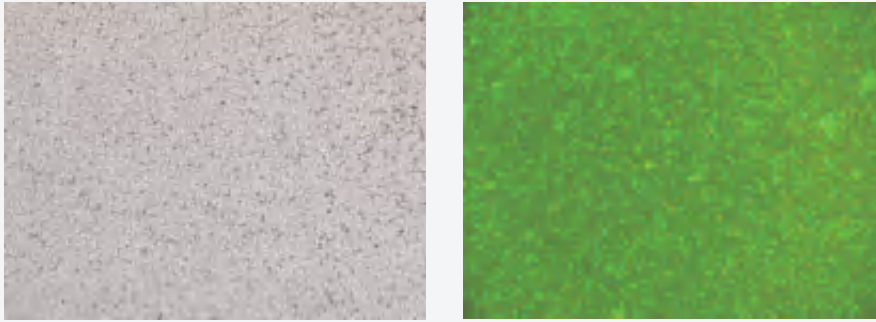


图2. 按照本文的实验方法, 使用表达绿色荧光蛋白的慢病毒以MOI=10转导Ba/F3细胞。100×参数下拍照。
左图: 明视野; 右图: 绿色荧光。