

# 慢病毒操作规范

文件编号: QW1103-03

版 次: A1

编 制: 莫素贤

审 核: 蒙伟能/分子生物部

批 准: 陈丽娟/管理者代表

实施日期: 2010-06-22

文 件 更 改 记 录				
版次号	修改页码	修改后页数	更 改 内 容 提 要	日 期
A0		9	第一次发行	2009-04-30
A1		13	全部	2010-06-22

## 1. 目的

规范慢病毒包装的操作, 稳定慢病毒的包装流程。

## 2. 适用范围

本标准适用于慢病毒包装工作

## 3. 职责

分子部门负责本文件的起草, 质量保障部及检验人员负责监督本标准的实施。

## 4. 慢病毒系统简介

慢病毒载体 (Lentiviral vector, LVs) 是在 HIV-1 (人类免疫缺陷 I 型病毒) 病毒基础上改造而成的病毒载体系统, 区别一般的逆转录病毒载体, 它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。它能高效的将目的基因 (或 RNAi) 导入动物和人的原代细胞或细胞系。慢病毒载体基因组是正链 RNA, 其基因组进入细胞后, 在细胞浆中被其自身携带的反转录酶反转录为 DNA, 形成 DNA 整合前复合体, 进入细胞核后, DNA 整合到细胞基因组中。整合后的 DNA 转录 mRNA, 回到细胞浆中, 表达目的蛋白; 或产生 RNAi 干扰。

为产生高滴度的病毒颗粒, 需要利用表达载体和包装质粒同时共转染细胞, 在细胞中进行病毒的包装, 包装好的假病毒颗粒分泌到细胞外的培养基中, 离心取得上清液后, 可以直接用于宿主细胞的感染, 目的基因进入到宿主细胞之后, 经过反转录, 整合到基因组, 从而高水平的表达效应分子。

## 5. 相差显微镜的使用技能

请参考《QW1401-02A0 CKX41 组织培养用显微镜使用、维护保养操作规程》。

## 6. 荧光显微镜的使用技能

请参考《QW1401-04A0 荧光显微镜使用、维护保养操作规程》

## 7. 超净台的使用技能

使用前打开电源, 关闭吹风, 打开紫外灯照射 30min, 30min 后打开吹风 (一般选“标准”模式); 使用时打开照明灯, 用酒精棉擦拭清洁台面; 使用完后关闭电源, 若只是暂时不用, 可将照明灯关闭, 吹风调至“低速”模式。

## 8. 超低温冰箱的使用技能

请参考《QW1401-11A0 超低温冰箱使用、维护保养操作规程》。

## 9. pH计的使用技能

请参考《QW1401-14A0 UB系列pH计使用使用、维护保养操作规程》。

## 10. 高糖基础培养液的配制技能 (1L体系)

### 10.1 组分

材料:	用量:
DMEM培养基/高糖 (Hyclone, 货号SH30003.04, 批号ATE32042PC)	13.4g
NaHCO <sub>3</sub> (BIOBASIC INC, Lot: LJ0205B5010J)	2g

## 10.2 配制方法:

A. 先将配制培养液的用平底塑料三角瓶和搅拌用的磁棒用自来水冲洗1~2次,再用纯净水冲洗1~2次,最后用注射用水洗1~2次,备用。

B. 称取13.4g DMEM培养基/高糖,放入洗好的三角瓶中,加入500ml注射用水,盖上瓶口用磁力搅拌器混匀。

C. 待 DMEM培养基/高糖 粉末溶解后,称取2g  $\text{NaHCO}_3$ 加入瓶中,再注入500ml注射用水补足1000ml,搅拌30min左右即可。

D. 将溶解好的基础培养液传入无菌室中进行过滤(用0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤),过滤好的基础培养基存入到无菌室的4℃冰箱的“待检区”中并做“无菌检测”,等检验合格后才可以使用。

注:将5ml左右过滤好的基础培养基吸到一个15mL离心管中,盖好盖子,在管壁上标记好送检物品的名称与批号,即可送去做“无菌检测”,并在检测表中填写送检物品的相关信息。

## 11. 磷酸钙转染使用试剂配制

### 11.1 $\text{CaCl}_2$ (2.5mol/L) 的配制

称 7.35g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (AMRESCO,批号:0007B038),用注射用水定容至 20ml,完全溶解后用 0.22 $\mu\text{m}$ 的滤器过滤除菌。

### 11.2 2×HEPES 盐缓冲液的配制

#### 11.2.1 组分

140 mmol/L     $\text{NaCl}$                     (天津市福晨化学试剂厂,批号:200711110)

1.5 mmol/L     $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (天津市福晨化学试剂厂,批号:20070604)

50mmol/L     HEPES                    (MBCHEM,批号:20080916)

#### 11.2.2 配制方法

取四个试剂瓶,在每个试剂瓶中分别加入 90ml蒸馏水、称取 0.8g  $\text{NaCl}$ 、0.0537g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.2g HEPES,充分溶解后用 0.5 mmol/L  $\text{NaOH}$ 调节pH值,四个瓶分别调节至 6.90, 6.95, 7.0, 7.05 四个pH梯度,用蒸馏水将体积补至 100ml,用 0.22 $\mu\text{m}$ 的滤器过滤除菌; 取出 5ml用于测试转染效果,其它-20℃保存。

大量转染之前,测试每个 pH 值的 HEPES 的转染效率(方法见后)。取效率最高的用于以后的转染。因为每个地方的水质不一样,而且每次配液 pH 有可能出现偏差,所以根据每个实验室自己的条件微调 pH。

将测试效果最好的HEPES分装成10ml等份, -20℃保存,一年内使用。

## 12. 0.1%明胶制备

称取0.08g 明胶(AMRESCO,批号:2178B404),加注射用水至总体积80ml;

121℃、15min灭菌后,置于4℃保存。

### 13. 293FT 细胞的培养

#### 13.1 293FT 细胞完全培养液的配制

试剂名称	体积 (mL)	成分体积比例
D-MEM(高糖) 基础培养基	900	90%
胎牛血清	100	10%

注: 配制前, 应核对所使用 D-MEM(高糖)的成分。Hyclone 的 D-MEM(高糖)粉剂已含有 4mM L 型谷氨酰胺,但是不含丙酮酸钠和非必需氨基酸, 如需要则另外添加。

#### 13.2 293FT 细胞冻存液的配制

试剂名称	体积 (mL)	成分体积比例
D-MEM(高糖) 基础培养基	60	60%
胎牛血清	30	30%
DMSO	10	10%

注: 配制冻存时, 应把 DMSO 缓慢加入已预冷的完全培养液中 (DMSO 溶解散热, 温度过高会破坏培养基成分), 并不时摇匀。冻存细胞前, 应该预冷冻存液至 4℃, 减少 DMSO 对细胞的损伤。

#### 13.3 293FT 细胞的复苏

##### 13.3.1 准备材料:

- 1瓶HD 完全培养液
- 1个T75培养瓶
- 2根15mL离心管
- 2根吸管
- 1个废液缸
- 1 个 37℃水浴

##### 13.3.2 方法

A.先将完全培养液从 4℃中取出放置到室温预热 30min 左右。在超净台内, 用吸管吸取 6~7mL 完全培养液至 15mL 离心管中;

B.快速将冻存的细胞从液氮中取出, 并迅速用镊子夹住盖子放入 37℃水浴中快速晃动 (水不要没到盖子), 使其在 1~2 分钟内完全融化 (融解过程, 可目测融解的程度, 还剩一点固体没融解即可将其拿至超净台);

注: 细胞所在位置可从“细胞库存布局表”中查看, 详情可参考《QW1302-01A0 细胞库管理规程》;

C.在超净台内, 用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒, 用吸管吸取所有融化的细胞悬液至装准备好的完全培养液中, 盖上盖子。拿至离心室离心收集细胞, 22℃、1100rpm离心 4 分钟。离心后, 拿至超净台, 小心倒去上清, 倒时管口不要太靠近废液缸, 用吸管吸取 2ml新鲜完全培养液重悬细胞至单细胞悬液, 再转移至装有 15ml完全培养液的T75cm培养瓶中, 写上细胞名称、日期, 放置 37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内培养。

#### 13.4 293FT 细胞传代

##### 13.4.1 准备材料:

1瓶HD 完全培养液  
4个培养瓶  
1根0.25%的胰酶  
1瓶1×PBS  
3根15mL离心管  
4根吸管  
1个废液缸

#### 13.4.2 方法:

A. 待细胞长至 90%融合度即可传代。把T-75cm<sup>2</sup> 培养瓶里的所有培养液倒至废液缸,用 1×PBS(每次约 2 吸管)洗涤细胞 2 次(洗涤要快),以去除残余的培养液和血清(血清含有胰酶的抑制因子);

B. 加入 20 滴 PBS 和 10 滴胰酶溶液,并使其完全浸过细胞,室温孵育 1-2 分钟。在显微镜下观察,可看到大部分细胞变圆不贴壁,拍打培养瓶 2 侧会有大量细胞脱离,此时应立即终止消化,若细胞仍然有大部分贴壁,可适当延长孵育时间;

C. 加入 5mL 完全培养液终止(约 2 吸管)消化,并用吸管吹打细胞 2-3 次使所有细胞彻底脱壁。接着用吸管转移细胞悬浮液到一支 15ml 离心管中,并用 1 吸管的 PBS 将残余细胞洗下来,一起加到 15ml 离心管中,盖上盖子;

D. 收集细胞。22℃、1100rpm 离心 4 分钟,离心后,打开盖子倒去上清,用 2ml 完全培养液重悬细胞;

E. 按照  $2-5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  的细胞密度接种细胞(1: 4 传);

F. 写上细胞名称、日期,放置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养。

注: 细胞生长达到80%-90%融合度即可传代,不可生长过密;

### 13.5 293FT 细胞的冻存

#### 13.5.1 准备材料:

1瓶HD 完全培养液  
1瓶HD 冻存液  
1根0.25%的胰酶  
1瓶1×PBS  
3根15mL离心管  
3根吸管  
1个废液缸

#### 13.5.2

A. 待细胞长至 90%融合度即可传代。把T-75cm<sup>2</sup> 培养瓶里的所有培养液倒至废液缸,用 1×PBS(每次约 2 吸管)洗涤细胞 2 次(洗涤要快),以去除残余的培养液和血清(血清含有胰酶的抑制因子);

B. 加入 20 滴 PBS 和 10 滴胰酶溶液,并使其完全浸过细胞,室温孵育 1-2 分钟。在显微镜下观察,可看到大部分细胞变圆不贴壁,拍打培养瓶 2 侧会有大量细胞脱离,此时应立即终止消化,若细胞仍然有大部分贴壁,可适当延长孵育时间;

C. 加入 5mL 完全培养液终止 (约 2 吸管) 消化, 并用吸管吹打细胞 2-3 次使所有细胞彻底脱壁。接着用吸管转移细胞悬浮液到一支 15ml 离心管中, 并用 1 吸管的 PBS 将残余细胞洗下来, 一起加到 15ml 离心管中, 盖上盖子;

D. 收集细胞。22℃、1100rpm 离心 4 分钟, 离心后, 打开盖子倒去上清, 用冰冷的 4ml 冻存液重悬细胞;

E. 用吸管吸取细胞悬液平均分装至 4 根冻存管中, 旋紧盖子, 写上细胞名称、代次、冻存日期;

F. 将冻存管放置于速冻盒中, 在将速冻盒放置超低温冰箱内;

G. 过夜后, 将冻存管转移至液氮罐内保存, 同时如实准确地填写“细胞入库记录表”。(详见《QW1302-01A0 细胞库管理规程》)

注: 1. 冻存盒与冻存液需 4℃ 预冷后使用

2. 需取出冻存盒时, 需填写“冻存盒使用记录”, 记录取出时间, 并按专人专盒的原则将细胞放置于 -80℃ 超低温冰箱细胞冻存人员专用的临时储存区中

## 14. 慢病毒包装

### 14.1 慢病毒包装前的准备工作

#### 14.1.1 准备质粒。

预先抽提含目的基因的慢病毒表达质粒及辅助质粒 (SL3、SL4、SL5), 并使用分光光度仪检测其纯度和浓度。质粒浓度在  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  左右, OD260/280 在 1.75~1.85 之间, 注意无菌

#### 14.1.2 准备 293FT 细胞。

A. 第一周星期三复苏 293FT 细胞;

B. 第一周星期五按照 1: 4 传代细胞至 T75 瓶中;

C. 第二周星期一按照相应的细胞密度接种细胞至 100mm 培养皿中;

注: 293FT 细胞的生长状态影响病毒的生产。应使用复苏后传代培养至少两代的 293FT 细胞包装慢病毒, 但不能使用超过 20 代的细胞。将细胞传到包被了明胶的 10cm 培养皿中。(若要用于脂质体方法包装慢病毒则按一个 10cm 培养皿  $5 \times 10^6$  个细胞传, 磷酸钙法包装病毒按一个 10cm 培养皿  $3 \times 10^6$  个细胞传)

#### 14.1.3 10cm 培养皿处理

10cm 培养皿在接种 293FT 前需用明胶包被。吸 2 管 0.1% 明胶到一个 10cm 培养皿中, 使其完全没过皿底, 室温静置 30min; 30min 后将皿中的水吸出, 打开皿盖晾置 40min 左右使残液蒸干 (若残液过多则可用移液器小心吸掉) 即可用于接种细胞。

## 14.2 转染

### 14.2.1 脂质体方法包装慢病毒

#### 14.2.1.1 准备材料

3 管各种辅助质粒各

1 管慢病毒表达质粒

接种好的 293FT 细胞

1 管 Lipofectamine 2000 转染试剂

1 瓶无血清 Opti-MEM<sup>®</sup> I 培养液 (预热至 37℃)

1 瓶不含抗生素的完全培养液 (预热至 37℃)

若干无菌的 2ml 和 5ml LEP 管



若干无菌的15mL/50mL离心管

#### 14.2.1.2 步骤

1) 转染前一天(第二周星期一), 接种 293FT细胞到一个 10cm培养皿中, 接种细胞数量应以转染当天的细胞生长达到 90%~95%融合为佳(一个 10cm培养皿接种  $5 \times 10^6$  个细胞, 加 10mL含血清培养液培养);

注: 培养液不能含有抗生素, 细胞接种要均匀。

2) 转染当天(第二周星期二), 观察细胞能否包装病毒。主要观察的指标是: 细胞是否接种均匀, 细胞的融合程度是否达到 90%~95%。若细胞的状态合适, 则从 293FT 细胞中去除培养液, 加入 5mL 新鲜的含血清培养液。培养液不含抗生素;

注: 避免细胞脱壁, 培养液应先预热至 37℃, 并沿壁加新鲜入培养液。

3) 准备 DNA-Lipofectamine2000 复合物, 以一个 10cm 培养皿的用量为示范:

A. 准备一支无菌的 2mLEP 管, 加入 1.5mL 无血清 Opti-MEM I 培养液、12μg 的辅助质粒混合物(SL3、SL4、SL5 各 4μg) 和 4μg 慢病毒表达质粒, 充分颠倒混匀;

注: 无血清 Opti-MEM I 培养液需预热至 37℃

B. 准备另外一支无菌的 5mLEP 管里, 加入 1.5mL 无血清 Opti-MEM I 培养液和 40μL 的 Lipofectamine2000, 轻轻颠倒混匀。室温孵育 5 分钟;

注: 使用 Lipofectamine2000 前, 应轻轻颠倒几下装有 Lipofectamine2000 的商品管。

C. 5 分钟后, 把含有质粒 DNA 的无血清 Opti-MEM I 培养液加入到含 Lipofectamine2000 的无血清 Opti-MEM I 培养液, 轻轻颠倒混匀。室温孵育 20 分钟;

D. 20 分钟后, DNA- Lipofectamine2000 复合物形成;

注: 溶液有可能变混浊, 但是不会影响转染效果。

4) 把 DNA- Lipofectamine2000 复合物一滴一滴地添加到 293FT 细胞中, 轻轻地前后摇晃培养皿以混匀复合物。放置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中过夜培养;

5)

6)

12)

注: 病毒不可反复冻融。在 -80℃ 度冰箱中保存不可超过一年。储存超过了六个月之后, 要重新测定滴度。

### 14.3 磷酸钙转染方法

#### 14.3.1 准备材料

3管各种辅助质粒各

1管慢病毒表达质粒

接种好的293FT细胞

1管Lipofectamine 2000 转染试剂

1瓶无血清Opti-MEM<sup>®</sup> I 培养液 (预热至 37℃)

1瓶不含抗生素的完全培养液 (预热至 37℃)

若干无菌的2ml和5mLEP管



若干无菌的15mL/50mL离心管

CaCl<sub>2</sub> (2.5mol/L) (需用 0.22μm 的滤器过滤除菌)

2×HEPES 盐缓冲液

无菌注射用水

#### 14.3.2 步骤

- (1) 在转染前一天, 通过胰酶消化收集细胞, 以  $3 \times 10^6$  个细胞平铺到 10cm 培养皿中, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 培养过夜, 待细胞长到融合度达 60% 左右进行转染。

注: 一瓶长满细胞的 T75cm<sup>2</sup> 可铺 7~8 个培养皿, 第二天细胞融合度即可达 60% 左右。

- (2) 在转染前 1 个小时换 10ml 37°C 预热的培养基 (DMEM+10%FBS)。

- (3) 按照下述方法制备磷酸钙-DNA 沉淀:

- 质粒、试剂用量 (一个培养皿为例): SL3、SL4、SL5、目的基因质粒各 4μg, 50μl 的 CaCl<sub>2</sub> 和灭菌水, 终体积为 500μl。
- 钙-DNA 混合物。在一个 5ml 灭菌 EP 管中先加入 2.5mol/L CaCl<sub>2</sub> 50μl, 再加入算好灭菌水, 用指轻轻弹匀, 然后分别加入 SL3、SL4、SL5、目的基因质粒各 4μg 混匀。
- 取另一支干净的 5ml EP 管, 加入 500μl 2×HEPES。
- 将含有 HEPES 的 5ml EP 管置于涡旋振荡器上, 使液体产生涡旋, 然后逐滴加入钙-DNA 混合物, 整个过程大约一分钟 (不要太快, 也不要太慢), 滴完后再涡旋几秒, 静置 20 分钟。

- (4) 静置完后, 用枪头吹打磷酸钙-DNA 沉淀 8 次左右, 然后将磷酸钙-DNA 悬液滴加到上述细胞的细胞培养基中, 轻轻混匀培养基, 培养基变成橘黄色。显微镜下观察, 细胞皿中有大小不一的沉淀。放置 37°C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中过夜培养;

注: 测试各个梯度的 pH 的转染效果可用 6 孔板进行, 用 0.2ml (即上述用量的 1/5) 体系即可, 方法同上, 但是选择 1.5ml 的 EP 管作为反应容器。

#### 14.4 换液:

##### 14.4.1 准备材料:

1 瓶不含抗生素的完全培养液 (预热至 37°C)

若干无菌的 15mL 离心管

若干吸管

#### 14.4.2 方法:

转染后一天(第二周星期三), 去除含有 DNA- Lipofectamine2000 复合物的培养液, 并加入 10mL 不含抗生素的完全培养液(先预热至 37℃)。放置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱继续培养;

注: VSV-G 糖蛋白的表达会引起 293FT 细胞的融合, 从而导致出现一些大的多核的细胞, 称为多核合胞体。类似的形态改变是正常的, 不会影响慢病毒的生产

### 14.5 收集与浓缩病毒

#### 14.5.1 准备材料:

- 1瓶不含抗生素的完全培养液(预热至 37℃)
- 若干无菌的100mm细胞培养皿
- 若干无菌的15mL/50mL离心管
- 若干吸管
- 若干0.45μm小滤器
- 若干0.5ml进口冻存管 (AXYGEN LOT NO.090827-903)
- 若干无菌的高速离心管

#### 14.5.2 方法

- 1) 转染后 48 小时(第二周星期四), 收集含有病毒的培养液。把培养液吸到一支无菌的有盖 50ml 离心管中, 再补加 10ml 新鲜完全培养液至还能产毒的细胞中;
- 2) 4℃、3000rpm 离心 15 分钟, 低速离心病毒上清, 去除细胞碎片, 回收上清。;
- 3) 将上清倒至无菌的 100mm 细胞培养皿中, 用 30ml 注射器吸取上清后, 将 0.45μm 小滤器套在注射器嘴上, 缓慢推压活塞, 使上清经过小滤器流出, 以彻底去除细胞碎片, 然后用 30ml 高速离心管收集滤液;
- 4) 使用水平转子高速离心收集病毒颗粒。4℃、50000×g 离心 90 分钟;
- 5) 倒掉废液, 按照 100ul 完全培养液融解一个皿产出的病毒沉淀加入新鲜完全培养液, 用 200ul 枪头缓慢而充分地催打沉淀至单个病毒悬液;
- 6) 按照每管 100ul 病毒液分装到 0.5ml 冻存管中(分装前, 应将标有病毒名称、批号的标签贴在冻存管外壁), 放置-80℃保存。填写病毒入库记录;
- 7) 转染后 72 小时(第二周星期五), 收集含有病毒的培养液。按照 2) -6) 再一次浓缩收集病毒颗粒

### 14.6 病毒送检“无菌检测”

浓缩后的病毒要送质量部门(QA)检测病毒是否污染细菌。

方法: 准备一个装有 5mL 左右 PBS 的 15mL 离心管, 将病毒收集管中残余液用 PBS 润洗吸入到 15mL 离心管中, 盖好盖子在管壁标明名称和批号即可送去做“无菌检测”, 并在检测表中填写送检物品的相关信息。

#### 14.7 病毒送检“滴度检测”

主要由 QA 负责检测, 包装病毒当周预先告知 QA, 以便准备细胞, 若 QA 已准备好用以检测的细胞, 此时则要从 -80℃ 冰箱中的冻存盒内取出已准备好的 50μl 病毒, 放在 -80℃ 冰箱的空白地带, 并告知 QA。

取好病毒后要在“病毒送检表”中填写病毒信息, 在“病毒出库记录台帐”上作记录。并在库存记录本的位置表上划去。

### 15. 测定病毒滴度 (主要由 QA 检测)

#### 准备材料:

- 病毒
- 贴壁哺乳动物细胞
- 贴壁哺乳动物细胞的完全培养液
- 6 mg/ml 聚凝胺 (可选)
- 六孔板
- 1×PBS
- 10μg/μL 的嘌呤霉素
- 龙胆紫 (结晶紫) 染色液

A液: 结晶紫(crystal violet) 1g

95%酒精 20ml

B液: 草酸铵(ammonium oxalate) 0.8g

蒸馏水 80ml

混合A、B二液, 静置48小时后使用。

#### 步骤:

1) 转导前一天 (第 1 天), 胰酶消化细胞并计数细胞密度, 按照合适的细胞密度接种到 6 孔板中, 能使转染当天的融合度达到 30%-50%。放置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱过夜培养。例如: 如果用 HT1080 细胞测定滴度, 通常一个六孔版的孔接种  $2 \times 10^5$  个细胞;

2) 转导当天 (第 2 天), 融解病毒, 准备 10 倍稀释系列样品, 稀释倍数从  $10^{-2}$  到  $10^{-6}$ 。对于每一个稀释样品, 用完全培养液稀释病毒至总体积 1mL。避免漩涡震荡;

注: 如果需要, 可以准备范围更广的 10 倍稀释系列样品 ( $10^{-2}$  -  $10^{-8}$ )。

3) 去除细胞中的培养液, 加入已含有不同病毒量的完全培养液。另外, 保留一孔不添加病毒的细胞, 作为空白对照组。注: 每孔加入的培养液的体积应为 1mL;

4) (可选) 在含有病毒的培养液中加入聚凝胺, 促进病毒感染细胞。轻轻地摇晃培养板以混匀聚凝胺。放置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱过夜培养;

注: 一般 polybrene 的储液浓度是 6mg/ml (用超纯水配制, -20 度储存, 注意分装, 反复冻融三次以上将大大降低效果)。工作浓度是 6ug/ml。

5) 转染后一天 (第 3 天), 去除含有病毒的培养液, 加入 2mL 新鲜的完全培养液。放置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱过夜培养;

6) 转染后两天 (第 4 天), 去除培养液, 加入含有适当浓度的嘌呤霉素的完全培养液以筛选稳定转导的细胞;

7) 每 3 天更换含有嘌呤霉素的新鲜培养液;

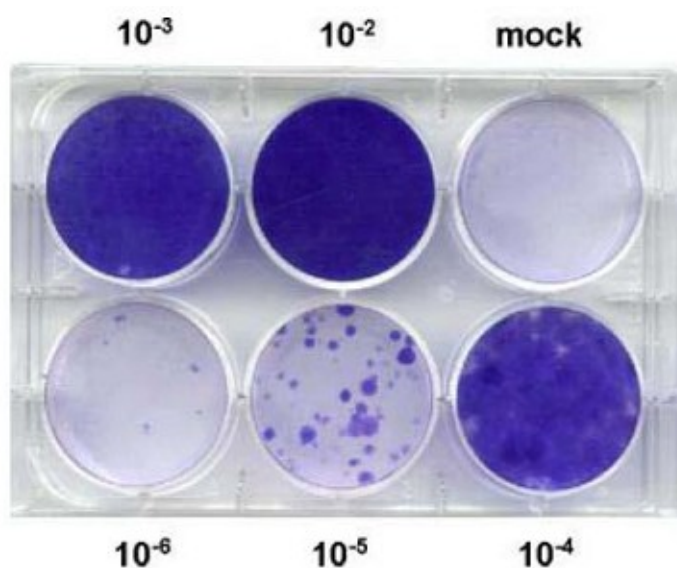
8) 筛选数天后, 可以看到对照组没有活细胞, 而添加过病毒的 1 个或者更多的孔会出现药物抗性的克隆。去除培养液, 用 PBS 洗涤细胞 2 次。注: 筛选所需天数应以对照组的所有细胞死亡为准;

9) 加入龙胆紫染色液 (6 孔板每孔 1mL) 并放置室温孵育 10 分钟;

10) 去除染色液, 用 PBS 洗涤细胞 2 次;

11) 计数被染成蓝色的克隆数目, 并计算病毒滴度。

例子:



在上面的培养板中, 各孔的克隆数目情况如下:

- 对照组: 没有克隆
- 10<sup>-2</sup> 稀释孔: 克隆融合, 不能计数
- 10<sup>-3</sup> 稀释孔: 克隆融合, 不能计数
- 10<sup>-4</sup> 稀释孔: 克隆融合, 不能计数
- 10<sup>-5</sup> 稀释孔: 46
- 10<sup>-6</sup> 稀释孔: 5

因此, 浓缩后的病毒的滴度是  $4.8 \times 10^5$  transducing units (TU) /mL ( $46 \times 10^5$  和  $5 \times 10^6$  的平均数)。一般情况, 病毒滴度范围是  $1-5 \times 10^5$  (没有浓缩) 到  $2 \times 10^7$  (浓缩后) TU/mL。

## 16. 慢病毒的出入库

## 16.1 病毒产品名称书写规则

- 所有病毒产品的名称格式如下:

“病毒缩写名称”+“-”+“目的基因缩写名称”+“/”+“抗药性基因缩写名称或者报告基因缩写”。

- 各类病毒名称缩写如下:

慢病毒 (lentivirus): lenti;

腺病毒 (adenovirus): adeno;

逆转录病毒 (retrovirus): retro;

- 产品名称书写例子:

一种携带了目的基因ISL-1和抗药性基因puromycin的慢病毒产品的命名如下: lenti-ISL-1/Puro

- 病毒产品标签格式:

病毒产品名+病毒批号+储存条件, 如:

Product Name: lenti-ISL-1/Puro

LOT.NO: 100511MBS01

Store at: -80°C

注: 病毒批号“100511MBS01”中: “100511”为日期 10 年 05 月 11 日, “MB”为分子部门缩写, “S”为个人名字 Sandy 的首字母, “01”为当次所包的病毒批号 (如同时包的有 2 种病毒, 则其中一种为“01”, 另一种为“02”)。

## 16.2 病毒存放规则

请参考《QW1303-01A1 病毒库管理暂行条例》