

# 慢病毒 (LV) 包装手册

## 载体构建

可见“基因调控”中载体构建部分

## 质粒转染和病毒收获

### 293T 细胞培养

转染前，用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞，用含 10% 血清的培养基调整细胞密度至  $5 \times 10^6$  细胞/15 mL，重新接种至 10 cm 培养皿中，37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。待细胞密度达到 70 %-80 % 时进行转染。

### 转染前 2 hrs 更换培养为无血清培养基

### 混合和培养

向已灭菌的离心管中加入制备好的 DNA 溶液和相应体积的转染试剂，混合均匀后调整总体积为 1 mL，室温下孵育 15 min。随后将混合液缓滴入 293T 细胞培养液中，轻轻混匀，37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。

### 换液和继续培养

培养 6 hrs 后弃去含转染混合物的培养基，加入 10 mL 的无菌 PBS 清洗一次，轻轻晃动培养基洗涤残余的转染混合物并倒弃。缓慢加入含 10% 血清的新鲜培养基 20 mL，37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养 48-72 hrs。

## 病毒浓缩和纯化

### 过滤

根据细胞状态收集转染后 48 hrs（按转染为 0 hrs 计算）的 293T 细胞上清液，4 °C 下 4000 ×g 离心 10 min，去除细胞碎片。随后使用 0.45 μm 过滤器将上清液过滤至 40 mL 超速离心管中。

### 离心

将带病毒的过滤液在 4 °C 下 20000 ×g 离心 2 hrs，弃去上清（尽量去除管壁残留液体），加入病毒保存液或无菌 PBS 溶液或细胞培养液，轻轻吹打重悬。

**注：**为了减少病毒回收的损失，避免使病毒长时间暴露在室温下。

### 分装待测

充分混合溶解后，4 °C下 8000 ×g 离心 5 min，按需求分装上清液，保存待测。

### 病毒质粒检测

质量控制包括物理状态检测、无菌检测和病毒滴度检测。

#### 物理状态检测

可通过颜色和粘稠度判断病毒质量，肉眼可见病毒保存液成澄清液体状，且用移液器（20-200 μL）吸取时无明显的粘稠感和吸取滞后感。

#### 无菌检测

将病毒加入 293T 细胞验证，正常培养 24 hrs 后镜检，无任何细菌和真菌感染，细胞间隙无明显颗粒存在，且培养基澄清透明。

#### 滴度检测

可采取荧光法和药筛法测定滴度。

##### 1) 荧光法

- ① 测定前 1 天，使用 293T 贴壁细胞铺板，以 96 孔板为例，每孔  $4 \times 10^4$  个细胞，体积 100 μL；
- ② 根据预期病毒滴度，准备无菌 EP 管，每管加入 90 μL 无血清培养液；
- ③ 取待测的病毒原液 10 μL 加入 1 号 EP 管中，混匀后取 1 号管中混合液 10 μL 加入 2 号管中，以此类推，直至最后一个 EP 管；
- ④ 移除设定好的细胞孔中培养基 90 μL，加入稀释好的病毒溶液，培养箱培养；
- ⑤ 培养 24 hrs 后，轻轻加入完全培养基 100 μL；
- ⑥ 4 天后观察荧光表达情况，荧光细胞随稀释倍数增加而减少。

##### 2) 药筛法

步骤 1-5 同荧光法，在感染 72 hrs 时加入抗性药物 puromycin，维持药物浓度 5 μg/mL。继续培养 24 hrs，观察细胞生长情况。

##### 3) 绝对定量 qPCR

- ① 制备标准品  
构建含保守序列 a 的质粒标准品 A 和含工具细胞 293T 基因组内单拷贝基因 b 的质粒标准品 B，浓度  $1E+10$  copy/μL，分装后低温保存。
- ② 引物设计和制备  
根据质粒标准品 A 和 B 设计 qPCR 引物，并配引物置工作液。
- ③ 制备样品  
以  $5E+4$  cell/孔培养 293T 细胞，感染时收集 2-3 孔空细胞计算每孔细胞总数 N。每孔感染病毒体积 V mL，重复 3 次。感染后 24 hrs 每孔加入 1 mL 完全培养基，72 hrs 后吸去上清，荧光拍照。

- ④ 基因组抽提  
使用基因组抽提试剂盒收集细胞的基因组。
- ⑤ 稀释标准品和样品  
按照 10 倍梯度稀释法稀释标准品。
- ⑥ PCR 反应  
根据 PCR 反应体系配制反应液，设定程序为两步法 Real-Time 定量。PCR 结束后制作溶解曲线，其后读取吸光值。具体反应时间和步骤可参见下表 1。

表 1 PCR 反应体系

Segment 1	(1x)	
Step 1	95 °C	15 s
Segment 2	(40x)	
Step 1	95 °C	5 s
Step 2	60 °C	30 s
Data collection and real-time analysis enabled		
Segment 3	(1x)	
Step 1	95 °C	60 s
Step 2	60 °C	5 s
Step 3	60-95 °C (+0.5 °C/step)	30s

### 滴度分析

若为荧光标记的病毒（荧光法检测），则观察孔内荧光细胞数量，即病毒滴度=荧光细胞数/病毒原液量，单位 TU/mL。

若为带有 puromycin 抗性的病毒（药筛法检测），通过感染后的活细胞数计算病毒滴度，即病毒滴度=活细胞数/病毒原液量，单位 TU/mL。

若使用绝对定量 qPCR 法检测，则 qPCR 滴度= $N \cdot C / V$ ，其中 N 为感染时孔板内的细胞数量；C 为每个细胞中含有的病毒个数，等于 A 拷贝数除以 B 拷贝数值的两倍，V 对应孔中感染慢病毒的体积（mL）。