

LV 感染 MOI 预实验手册

载体构建

MOI (Multiplicity of Infection) 为感染复数, 即病毒量与细胞数的比值。每种细胞对病毒的敏感性不同, 同时每种病毒载体荧光强度也存在差异, 另外, MOI 值越高, 病毒感染的可能性越大, 但是对细胞的毒性越大。因此正式实验前需要进行预实验以确定 MOI 值以达到理想的实验效果。

注: 如果 MOI 超过 100 (甚至 200), 感染实验还无法成功, 说明病毒非常难感染该细胞, 可以考虑更换病毒类型或使用电转化。

实验步骤

第一天: 细胞接种

1) 设置 MOI 梯度

设定病毒 MOI, 可选择 0, 20, 40, 60, 80, 100 的梯度设置, 或根据实际实验需求设置。

2) 分组

为了确定感染条件, 按照不同培养条件进行分组:

Control 组, 不感染病毒, 监控实验期间细胞生长情况。

M 组, 常规培养组, 观察常规培养条件下病毒对细胞的感染效果; 再按病毒 MOI 梯度分为不同小组。

B 组, 添加病毒试剂 (感染增强剂), 观察是否提升病毒感染效果; 可在 MOI 确定后, 以目标 MOI 进行感染效果比较。

注: B 组可选择不同的病毒试剂, 以了解最佳感染效果; 最好设置一组复孔, 以保证实验结果的可靠性。

3) 细胞接种

将状态好的目的细胞接种于细胞培养容器中, 计数后完成铺板。以 96 孔板为例, 用完全培养基制备 2 mL 密度为 1.25×10^5 个/mL 的细胞悬液, 按 80 μ L/孔加入板中。按照上述完成的分组加入病毒和试剂。

4) 感染前准备

取出病毒在冰上融化, 用无血清培养基稀释至目标滴度。

5) 感染操作

在板孔中加入对应体积的溶液, 感染后 8-12 hrs 向每孔中加入 100 μ L 常规培养基, 保持细胞正常生长。

6) 感染后换液

悬浮细胞换液，收集孔板中细胞至干净的 EP 管中，2000 rpm 离心 2 min 收集沉淀，加入完全培养基轻轻混匀后，转移至培养板继续培养。

贴壁细胞换液时，在培养器皿中心小心吸取旧培养基，后更换枪头注入新鲜培养基，沿培养皿壁往下缓慢的注入，避免冲散贴壁的细胞。

第二至三天：继续培养

中间可换液，保持细胞活性。换液方式同“感染后换液”。

第四天：观察感染效率，进行后续实验

感染后 72 hrs，在荧光显微镜下观察细胞，估计病毒感染目的细胞的效率。若荧光弱，可到 96 hrs 后观察。根据实际感染情况，调整 MOI。

感染条件及 MOI 的选择原则

- 1) 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 可作为后续实验的参考依据；
- 2) 在细胞形态不受影响的情况下，尽可能用少的病毒感染细胞；
- 3) 病毒试剂 Polybrene 对部分细胞毒性较大（如原代神经元，树突细胞等），不确定是否添加时，可增加一组实验。即只加病毒试剂 Polybrene 不加病毒，跟 control 组进行比较细胞生长情况。

常见细胞 MOI 和感染条件

表 1 常见细胞参考 MOI 和感染条件

疾病类型	细胞系	中文名	病毒	MOI	感染试剂
ALL	CCRF-CEM	人急性淋巴细胞白血病 T 淋巴细胞	逆转录病毒	50	B-2
	HuT 78	人 T 淋巴细胞白血病细胞	慢病毒	20	B-1
	Jurkat	人 T 淋巴细胞白血病细胞	慢病毒	20	B-2
	MOLT-4	人急性淋巴母细胞白血病细胞	慢病毒	40	B-1
	Daudi	人 Burkitt's 淋巴瘤细胞	逆转录病毒	30	B-2
	Reh	人急性非 B 非 T 淋	慢病毒	30	B-1

企业名称：布林凯斯生物技术有限公司

地址：中国·武汉经济技术开发区 华中智谷

Tel: +027-8439-6606 | E-mail: j.li@wiat.ac.cn

巴细胞白血病					
AML	NB4	人早幼粒白血病细胞	慢病毒	50	B-2
	THP-1	人单核细胞白血病	慢病毒	30	B-1
	HL-60	人骨髓细胞白血病细胞	慢病毒	30	B-2
	HEL	人红白细胞白血病细胞	慢病毒	30	B-1
CML	K-562	人慢性髓原白血病细胞	慢病毒	30	B-2
Acute T Cell Leukemia	I 2.1	人急性 T 淋巴细胞性白血病细胞	慢病毒	30	B-2
Basophilic Leukemia	RBL-2H3	大鼠嗜碱性细胞白血病细胞	慢病毒	40	B-1
Hairy Cell Leukemia	Mo[Mo T]	人毛细胞白血病细胞	慢病毒	20	B-1
Leukemia	OKT 11	小鼠 B 淋巴细胞, 小鼠淋巴瘤细胞	逆转录病毒	50	B-2
Lymphocytic Leukemia	L1210	小鼠白血病细胞	慢病毒	50	B-2
Myelomonoblastic Leukemia	CESS	人急性髓系白血病细胞	慢病毒	40	B-2
Plasma Cell Leukemia	ARH-77	人多发性骨髓瘤细胞	慢病毒	20	B-2
Burkitt's Lymphoma	Ramos (RA 1)	人 B 淋巴细胞瘤细胞	慢病毒	20	B-1
Lymphoma	5EL4	小鼠淋巴瘤细胞	逆转录病毒	50	B-2
	JeKo-1	人套细胞淋巴瘤细胞	慢病毒	40	B-2
	YAC-1	小鼠淋巴瘤细胞	逆转录病毒	5	B-2
T-Cell Lymphoblastic Lymphoma	SUP-T1 [VB]	人 T 淋巴瘤细胞	慢病毒	20	B-2
Histiocytic Lymphoma	U-937	人组织细胞淋巴瘤细胞	慢病毒	30	B-1
AEIson Murine Leukemia Virus-Induced Tumor	RAW 264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	逆转录病毒	20	B-1

其他	SP2/0	小鼠骨髓瘤细胞	逆转录病毒	20	B-2
	MR1	中国仓鼠 x 小鼠 B 淋巴细胞杂交瘤	慢病毒	30	B-2
	35.1	小鼠 B 细胞 x 小鼠淋巴瘤杂交瘤细胞	逆转录病毒	50	B-2
	OP9	小鼠骨髓基质细胞	慢病毒	30	B-2
	Wistar 大鼠骨髓 MSC 细胞	Wistar 大鼠骨髓 MSC 细胞	慢病毒	10	B-2
	Sprague Dawley(SD)大鼠骨髓 MSC 细胞	Sprague Dawley(SD)大鼠骨髓 MSC 细胞	慢病毒	20	B-2
	MM.1S	人 IgA-I 骨髓瘤细胞	慢病毒	20	B-2

注：由于实验操作不同（细胞代数和状态等因素），MOI 值存在一定差异，以上数据仅供参考，建议通过预实验确定 MOI 值。