

LV 悬浮细胞感染实验手册

第一天：接种细胞

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，保证第二天感染病毒时汇合度达到 20%-40%。以 6 孔板为例，用完全培养基制备 10^5 个/mL 的细胞悬液，其单孔底面积 10 cm^2 ，接种体积 2 mL，感染试剂用量 $80\text{ }\mu\text{L}$ /孔。其余培养体系见下表 1。

表 1 不同细胞培养体系推荐接种体积和感染试剂用量

细胞培养容器	单孔底面积	接种体积	感染试剂用量
T25 孔板	25 cm^2	5 mL	$200\text{ }\mu\text{L}$ /孔
6 孔板	10 cm^2	2 mL	$80\text{ }\mu\text{L}$ /孔
12 孔板	4 cm^2	1 mL	$40\text{ }\mu\text{L}$ /孔
24 孔板	2 cm^2	500 μL	$20\text{ }\mu\text{L}$ /孔
48 孔板	0.6 cm^2	200 μL	$8\text{ }\mu\text{L}$ /孔
96 孔板	0.3 cm^2	100 μL	$4\text{ }\mu\text{L}$ /孔

第二天：感染

感染

根据细胞 MOI 和病毒滴度，加入对应量的病毒， $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 12-16 hrs。病毒量参考见下表。

计算公式：病毒体积 = (MOI × 细胞数目) / 病毒滴度

表 2 感染细胞病毒量参考（以病毒量 $1 \times 10^8\text{ TU/mL}$ 为例）

细胞培养容器	细胞数	MOI=1	MOI=10	MOI=100
T25 孔板	$\sim 5 \times 10^5$	5 μL	50 μL	500 μL
6 孔板	$\sim 2 \times 10^5$	2 μL	20 μL	200 μL
12 孔板	$\sim 1 \times 10^5$	1 μL	10 μL	100 μL
24 孔板	$\sim 5 \times 10^4$	0.5 μL	5 μL	50 μL
48 孔板	$\sim 2 \times 10^4$	0.2 μL	2 μL	20 μL
96 孔板	$\sim 1 \times 10^4$	0.1 μL	1 μL	10 μL

注：

- 1) 培养基总量必须充分覆盖细胞；
- 2) 病毒滴度可参见报告单；

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

3) 若病毒滴度过高，可先用无血清培养基稀释后再加入。

感染后换液

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。感染 24 hrs 后换液。

第三至四天：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”。

第五天：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。

注：

- 1) 一般代谢较旺盛的细胞（如 293T），48 hrs 后即可观察到荧光，代谢较为缓慢的细胞（如原代培养细胞、神经干细胞等）GFP（RFP）蛋白表达所需时间较长，感染后 72-96 hrs 才能观察到荧光；
- 2) 因过表达病毒载体中插入目的基因序列，可能荧光相比对照病毒稍弱；
- 3) 若载体中带有 cas9/dcas9 等大蛋白，建议感染后 7-10 d 后再进行下游实验。

注意事项：

- 1) 对于贴壁细胞，需在感染前一天接种细胞，接种时汇合度约为 20%-40%，可根据生长速度调整，保证在感染后 4 天时汇合度达到 90%-100%；
- 2) 对于原代细胞，由于细胞增长缓慢切传代能力较差，可在接种时提高汇合度，保证在感染后 4 天时汇合度达到 90%-100%；
- 3) 对于非分裂细胞，由于接种后不再增殖，需按照 100%汇合度接种；
- 4) 对于极难感染的细胞，可采用多次感染的方案，即完成一次感染后，重新加入新鲜病毒再次感染，需注意多次感染间细胞状态。