

LENTIVIRUS

慢病毒产品 使用说明

让基因递送触手可及！

Make Gene Delivery Accessible

CONTENTS

目录

01/ 慢病毒使用注意事项 01

GENERAL CONSIDERATIONS

- 1.1 操作安全注意事项 01
- 1.2 慢病毒储存 01
- 1.3 慢病毒稀释 01

02/ 慢病毒简介 02

PRODUCT SPECIFICATIONS

- 2.1 慢病毒简介 02
- 2.2 慢病毒特点 02
- 2.3 服务流程 02

03/ 慢病毒的感染操作 03

OPERATION PROTOCOL

- 3.1 慢病毒感染预实验 03
- 3.2 慢病毒感染贴壁细胞 05
- 3.3 慢病毒感染悬浮细胞 06
- 3.4 感染效果图 07

04/ 使用常见问题 09

FREQUENTLY ASKED QUESTIONS

05/ 客户发表文章列表 10

CLIENT PUBLICATIONS

※ 附录 11

APPENDIX

- 载体元件介绍 11
- 慢病毒感染细胞MOI 13
- 病毒感染检测时间 16
- 售后标准 17



订购说明

ORDERING INSTRUCTIONS

为了及时处理您的订单，在您确认价格和服务内容的同时请您提供以下信息：单位名称、负责人姓名、联系人姓名、联系方式、电子邮箱、发票抬头、收货地址以及特殊需求。

货物的发送与验收

.....

病毒产品我们会使用干冰快递寄送，当您收到产品后请第一时间验收产品名称、规格、数量以及状态是否正确。如果存在疑问，请立即与我司取得联系，我们会尽快为您解答！

和元生物工具中心

.....

1. 和元细胞库：现货细胞株1000+，包括肿瘤细胞株、正常细胞株及稳定细胞株
2. 和元cDNA文库：15000+
3. 和元质粒库：50000+，含各种启动子
4. 和元病毒载体库：45000+，包括光遗传工具、Cre工具病毒等
5. 和元sgRNA文库：全套人和小鼠的sgRNA敲除和激活文库，用于高通量筛选
6. 启动子100+，血清型80+

您还可以通过以下几种方式与我们联系，我们将竭诚为您服务：

.....

全国服务热线：400-151-5198 公司电话：021-5858 5887

商务邮箱：oobio@obiosh.com

总部地址：上海市浦东新区国际医学园区紫萍路908弄19号楼

01 慢病毒使用注意事项

GENERAL CONSIDERATIONS

1.1 操作安全注意事项

- 1) 防护措施：一次性手套、口罩、护目镜、实验服。
- 2) 操作环境：BSL-2实验室，生物安全柜，不推荐在开放的实验台操作。
- 3) 操作时小心病毒溅出，如果不慎溅出至皮肤或粘膜，大量清水冲洗5min，及时就医。
- 4) 病毒不慎溅出至操作台，应立即使用0.5%次氯酸钠，2%戊二醛，甲醛或75%乙醇进行擦拭。
- 5) 接触过病毒的耗材，需经新鲜配制10%的84消毒液（0.5%次氯酸）浸泡过夜或高压湿热灭菌(121°C，30min) 处理后丢弃。
- 6) 废弃的含有病毒的培养基或液体加入84消毒液（10:1），浸泡24h后丢弃。



1.2 慢病毒储存

- 1) 收到病毒后，应置于-80°C保存。
- 2) 为避免同一支病毒多次反复冻融，造成滴度下降，建议使用时进行分装。分装过程中要保证在无菌环境冰上操作，分装体积根据每次实验病毒用量进行分装，不宜过少，建议不低于10μL。分装后的病毒如在短期内使用，可将病毒暂时放置于4°C保存（一周内用完），余下的应在分装后立即置于-80°C保存。
- 3) 分装需采用无菌DNase/RNase-Free耗材，分装后封口膜封口保存。
- 4) 病毒有效期为1年，建议收到病毒后尽快使用。
- 5) 病毒储存6个月后，建议在使用前重新测定病毒滴度。

1.3 慢病毒稀释

根据实验需要，请在使用前将慢病毒置于4°C或冰浴溶解，用无菌的无血清培养基、完全培养基或无菌PBS稀释（如进行动物注射实验，建议注射前无菌生理盐水或PBS稀释）。稀释后的病毒建议立即使用，不建议再保存备用。

02 慢病毒简介

PRODUCT SPECIFICATIONS

2.1 慢病毒简介

慢病毒是一类改造自免疫缺陷病毒的病毒载体，基因组是RNA，可将外源基因整合到基因组中实现稳定表达，借助慢病毒载体可以进行基因的过表达、干扰、敲除和内源性激活等操作，满足不同的基因操作需求。

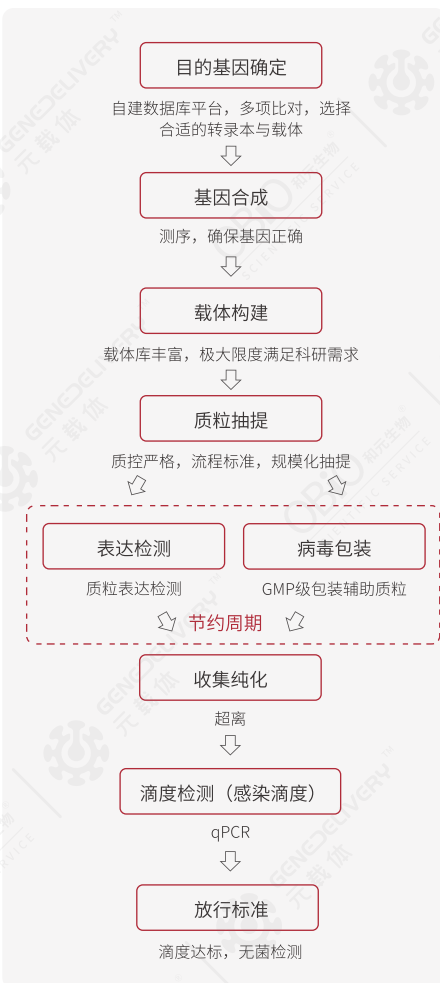
慢病毒载体具有宿主范围广，免疫原性低，基因容量大，可以长期表达等特点，具有感染分裂期和非分裂期细胞的特性，能够有效地感染培养的肿瘤细胞、肝细胞、心肌细胞、神经元、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞。

肿瘤研究领域常用慢病毒构建稳定株，或进行瘤内注射，进行基因功能研究，借助慢病毒载体改造T细胞可用于CAR-T细胞治疗。

2.2 慢病毒特点

- 1) **表达时间长**：慢病毒可将外源基因整合到宿主细胞基因组上，实现基因长时间稳定的表达，不随细胞分裂传代而丢失，是细胞实验的首选，常用于构建稳定株。
- 2) **安全性高**：未发现致病性，慢病毒载体改造T细胞用于CAR-T细胞治疗。
- 3) **免疫原性低**：直接注射活体组织不易造成免疫反应，适用于动物实验。

2.3 服务流程



03 慢病毒的感染操作

OPERATION PROTOCOL

3.1 慢病毒感染预实验

每种细胞对慢病毒的敏感性、易感程度不同，不同启动子的表达强度也存在差异，所以在正式实验前建议做病毒感染预实验来确认MOI以达到理想的实验效果。

感染复数（Multiplicity of Infection, MOI），含义为感染时病毒和细胞数量的比值，即平均每个细胞感染的病毒活性单位数（慢病毒单位为TU/cell）。

- 1) 在实验中细胞感染率达到80%的MOI定义为这种细胞的最适MOI。
- 2) 影响MOI的因素包括：细胞状态、目的基因本身及大小、启动子、细胞种类等。
- 3) 每孔加病毒量（ μL ）= MOI \times 感染时的细胞数/滴度（TU/mL） $\times 10^3$ 。

慢病毒感染MOI预实验步骤（24孔板）：

1) 第一天：细胞铺板

将状态良好的目的细胞接种至24孔细胞培养板中。

细胞消化后计数，将细胞悬液调整密度为 1×10^5 cells/mL，每孔加入500 μL 细胞悬液进行铺板。保证第二天感染病毒时细胞密度达到30~40%。通常，24孔板以 $5 \sim 10 \times 10^4$ cells/孔的密度铺板。

注：如果细胞较大可以适当减少细胞量，较小可以增加一定的细胞量。原则上以第二天感染病毒时细胞密度达到30%~40%为宜。细胞铺入培养板后前后左右轻轻摇动确保细胞均匀分布在细胞培养板中，放入CO₂培养箱进行培养。

2) 第二天：慢病毒感染

a) 按照下图设计不同的MOI实验组

- ① MOI通常依次设置为：0、10、20、40、80
- ② 同时设置加含5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene^[注]的培养基实验组
- ③ Blank组即空细胞组，作为参照，以检验细胞生长状态

	1	2	3	4	5	6
A Polybrene 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Blank	MOI=0 0 μL	MOI=10 1 μL	MOI=20 2 μL	MOI=40 4 μL	MOI=80 8 μL
B Polybrene 0	Blank	MOI=0 0 μL	MOI=10 1 μL	MOI=20 2 μL	MOI=40 4 μL	MOI=80 8 μL
C						
D						

细胞感染预实验分组设计

注：Polybrene是一种阳离子聚合物，可以中和电荷以促进假病毒外壳与细胞膜之间结合。Polybrene最佳浓度因不同细胞株而异，通常范围为2~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，可以通过预实验来摸索或查阅相关文献。Polybrene长时间的作用 (>12小时) 可能对某些细胞产生毒性作用，影响细胞状态，一些敏感的细胞如神经元等，不建议使用Polybrene。

b) 按照设置好的MOI计算每孔需要加入的病毒量。

每孔加病毒量(μL)= $\text{MOI} \times \text{感染时的细胞数}/\text{滴度}(\text{TU}/\text{mL}) \times 10^3$ 。

例如：病毒滴度 $5 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$ ，接种细胞数 5×10^4 ，

那么MOI为10的组中病毒量= $\frac{10 \times 5 \times 10^4}{5 \times 10^8} \times 10^3 = 1.0 \mu\text{L}$ ，依次类推。

c) 加入慢病毒

观察细胞状态良好，细胞密度达到30~40%时，加入慢病毒进行感染。

去除培养板中培养基，更换为新鲜的细胞完全培养基。按照b)中计算好的病毒量将病毒液分别加入培养基中，混匀，继续培养。

注：如果遇到每孔加的病毒体积太少，低于移液器量程的情况，可以先将病毒稀释后再加入。有关稀释的方法请参考慢病毒稀释部分。

完全培养基：基础培养基中加入一定含量血清、抗生素（通常为10%胎牛血清，1%链霉素-青霉素）等满足细胞生长的培养基。

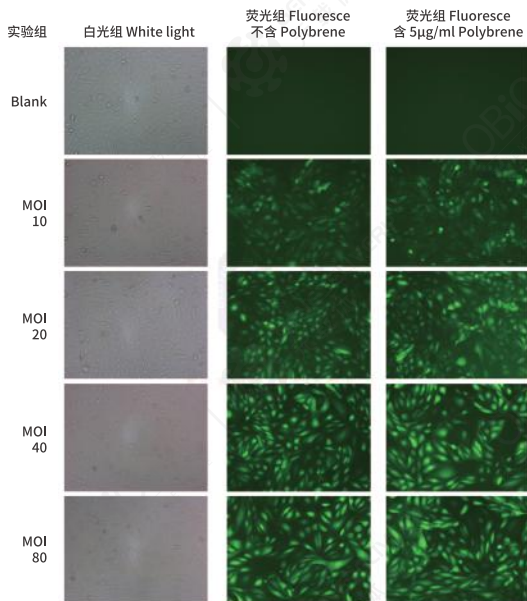
3) 第三天：换液

病毒感染12~16小时后，去除各实验组中培养基，更换为新鲜的细胞完全培养基，继续培养。

4) 第五天：观察，拍照，确定合适的MOI

a) 病毒感染后72小时在荧光显微镜下观察，并拍照。

b) 确定合适的MOI。选择感染效率达到80%左右，细胞生长良好细胞状态无明显影响组为该细胞的最适MOI。



A498细胞MOI测定结果示例，MOI=20

3.2 慢病毒感染贴壁细胞

以24孔板为例

1) 第一天：准备细胞

将状态良好的目的细胞接种至24孔细胞培养板中。

细胞消化后计数，将细胞悬液调整密度为 1×10^5 cells/mL，每孔加入500 μ L细胞悬液进行铺板。保证第二天感染病毒时细胞密度达到30~40%。通常，24孔板以 $5 \sim 10 \times 10^4$ cells/孔的密度铺板。

2) 第二天：病毒感染

a) 计算病毒加样量

根据预实验的结论，选择合适MOI和感染条件，进行病毒感染。

加样量计算方法： $(\text{细胞数} \times \text{MOI} / \text{病毒原液滴度}) \times 10^3 = \text{病毒加样量} (\mu\text{L})$

如细胞数为 5×10^4 ，MOI为20，病毒滴度为 5×10^8 TU/mL，病毒的加样量为2 μ L。

注：由于细胞状态总是有差异的，建议每次在选定MOI后，再分别设置高低MOI实验组，减少因细胞状态差异导致的感染效果差异。



b) 感染

观察细胞状态良好，细胞密度达到30~40%时，加入慢病毒进行感染。

按照预实验的结论确定是否加polybrene，去除孔板中培养基，更换为新鲜的细胞培养基，加入对应量病毒。（假设预实验的结论是在含5 μ g/mL Polybrene的DMEM培养基的条件下感染效果较好，则更换为含5 μ g/mL Polybrene的DMEM培养基，再加入病毒）

3) 第三天：换液

病毒感染12~16小时后，观察细胞状态，更换新鲜培养基。去除孔板中培养基，每孔加入500 μ L完全培养基。如细胞状态差，需尽快更换新鲜培养基；如细胞状态良好，可在24小时内进行换液，但不宜超过24小时

4) 第五天：观察表达情况

病毒感染细胞72小时后，如载体上有荧光蛋白（GFP、mCherry等元件）可在荧光显微镜下观察细胞，判断慢病毒感染目的细胞的效率。若荧光弱，可延长至96小时后观察。根据后续实验内容，选择合适的时间点进行实验。若载体上不含荧光蛋白，则无法直接通过荧光显微镜判断病毒感染效率，可进行qPCR、WB或目的抗体免疫荧光或目的抗体流式检测病毒表达情况。

3.3 慢病毒感染悬浮细胞



以24孔板为例

1) 第一天：接种细胞和感染

a) 接种细胞：用细胞完全培养基制备5~10 $\times 10^4$ cells/mL的细胞悬液，每孔加入500 μ L细胞悬液。

b) 感染：根据预实验的结论，选择合适MOI和感染条件，进行病毒感染。根据细胞MOI及病毒滴度，加入相应病毒量。

病毒量计算方法：病毒加样量（ μ L）=（细胞数 \times MOI/病毒原液滴度） $\times 10^3$

如细胞数为5 $\times 10^4$ ，MOI为40，病毒滴度为5 $\times 10^8$ TU/mL，病毒的加样量为4 μ L。

注：由于细胞状态存在差异，建议每次在选定MOI后，再分别设置高低MOI实验组，减少因细胞状态差异导致的感染效果差异。

将细胞培养板用封口膜密封，水平转子低速离心（<1200g）1小时（推荐），放回培养箱继续培养。

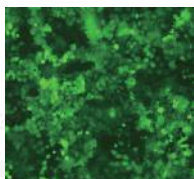
2) 第二天：病毒感染12~16小时后，收集细胞悬液离心后去除培养基，更换新鲜的完全培养基放回培养箱中继续培养。

3) 第四天：观察荧光表达情况

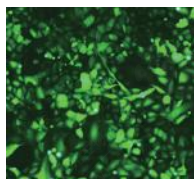
病毒感染细胞72小时后，在荧光显微镜下观察细胞，判断慢病毒感染目的细胞的效率。若荧光弱，可延长至96小时后观察。根据后续实验内容，选择合适的时间点进行实验。

3.4 感染效果图（部分）

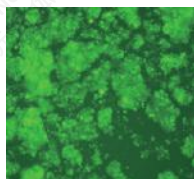
慢病毒载体具有宿主范围广，免疫原性低，基因容量大，可以长期表达等特点，能够有效地感染培养的肿瘤细胞、肝细胞、心肌细胞、神经元、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞。



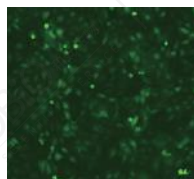
5-8F 人鼻咽癌细胞



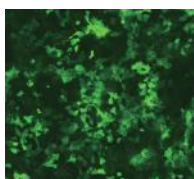
A549 人非小细胞肺癌细胞



Jurkat 人白血病T淋巴细胞



SK-OV-3 人卵巢癌细胞



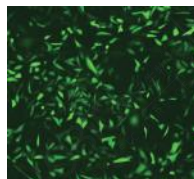
FaDu 人咽喉癌细胞



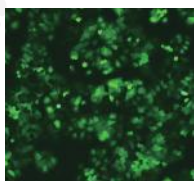
Hep G2 人肝癌细胞



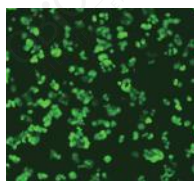
U2OS 人骨肉瘤细胞



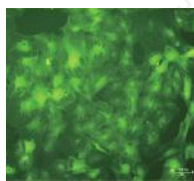
MDA-MB-231 人乳腺癌细胞



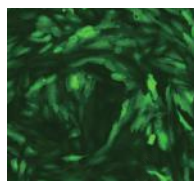
KYSE-150
食管鳞癌细胞



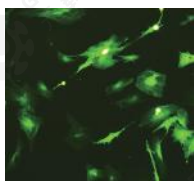
MDA-MB-468
人乳腺癌细胞



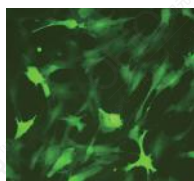
小鼠骨髓间充质干细胞
(原代分离)



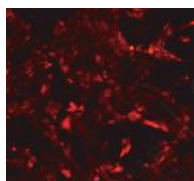
SW1353 人软组织肉瘤细胞



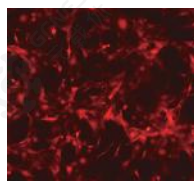
猪间充质干细胞
(原代分离)



大鼠星形胶质细胞
(原代分离)



ACHN 人肾细胞腺癌细胞



U-87 MG
人脑星形胶质母细胞瘤

慢病毒感染细胞效果图

不同培养体系对应细胞数、感染试剂用量及病毒量参考

细胞培养容器	单孔底面积	培养基体积	细胞数	Polybrene 用量/孔	Polybrene-plus 用量/孔	MOI=10病毒用量 (滴度 1×10^8 TU/mL)
96孔板	0.3cm ²	100μL	$\sim 1 \times 10^4$	0.5μL	1μL	1μL
48孔板	0.6cm ²	200μL	$\sim 2 \times 10^4$	1μL	2μL	2μL
24孔板	2cm ²	500μL	$\sim 5 \times 10^4$	2.5μL	5μL	5μL
12孔板	4cm ²	1mL	$\sim 1 \times 10^5$	5μL	10μL	10μL
6孔板	10cm ²	2mL	$\sim 2 \times 10^5$	10μL	20μL	20μL
T25瓶	25cm ²	5mL	$\sim 5 \times 10^5$	25μL	50μL	50μL

储存液浓度：Polybrene: 1μg/μL, Polybrene-plus: 100μg/μL

参考工作浓度：Polybrene: 5μg/mL, Polybrene-plus: 1μg/μL

* 细胞数量为推荐铺板细胞数量，需根据细胞大小调整铺板数量（以感染时细胞密度30%为宜），按照实际感染时细胞数量去计算病毒加入量。

* 为增加病毒与细胞接触的几率，可适当减少感染时培养基的体积。

04 使用常见问题

FREQUENTLY ASKED QUESTIONS

4.1 常见问题

01) 过表达或干扰目的基因之后，目的蛋白一定会上调或者下调吗？

答：由于蛋白调控过程比较复杂，目的抗体的特异性不确定，因此在对细胞进行过表达或者干扰调控后，不一定能在蛋白水平检测到上调或者下调。若目的抗体无法检测到过表达或者干扰效果，可尝试使用qPCR或者标签抗体进行检测。

02) 慢病毒载体可以作为常规的过表达质粒进行使用吗？

答：慢病毒载体可以作为常规过表达质粒进行使用，但是由于慢病毒载体骨架较大，整个质粒较普通真核载体大，针对本身难转染的细胞会影响转染效率。

03) siRNA和shRNA的区别是什么？常规干扰检测的分组该如何设置？

答：siRNA为直接合成针对靶基因的siRNA（合成的是RNA，不是DNA），通过转染的方法将siRNA递送到细胞或者体内，参与到RNAi，发挥使靶基因沉默的效应。siRNA为瞬时表达，作用时效48-72h左右。

shRNA为短双链RNA，包含一个茎环结构，可加工成siRNA。常规将此短双链结构以DNA的形式构建到载体上，以质粒或者病毒的形式递送到细胞或者体内，利用细胞内Dicer酶等，生成相应的siRNA，发挥RNAi作用。若是慢病毒或者AAV感染细胞或组织，可达到长期表达的效果。

常规干扰检测的分组：空细胞组，NC对照组，干扰目的组。

若使用siRNA的方法筛选得到的靶点，用于后续shRNA构建，则会因为shRNA还要经过剪切加工才能发挥作用，因此siRNA干扰效率不能完全等同shRNA干扰效率。

04) 过表达质粒/病毒，用目的抗体做表达检测时，检测不到过表达效果怎么办？

答：首先根据载体上带的元件排除感染或者转染效率问题，如荧光效率达到80%以上或者使用对应真核抗性的抗生素进行筛选，如果还是检测不到，可能有以下原因：

- ① 目的抗体特异性不好，蛋白有不同的剪切体，使用目的抗体无法检测到明显的过表达；
- ② 细胞本身的调控机制，使目的蛋白无法过表达多倍。建议换标签抗体或者PCR尝试检测。

05) Puro或者BSR抗生素筛选稳定株时，如何确定抗生素浓度？后续稳定株培养过程中需要持续加抗生素吗？

答：由于每种细胞对抗生素的敏感性不同，所以抗生素最佳浓度因不同细胞而异，具体可以通过做抗生素杀灭曲线来摸索。由于细胞培养传代过程中抗性基因表达可能出现减弱现象，建议持续加抗生素，维持细胞培养的药物浓度可减半。

* 更多问题参考慢病毒操作手册(电子版)

05 客户发表文章列表 (部分)

CLIENT PUBLICATIONS

[01] Cell.(IF=41.582).Xu M, Xu H H, Lin Y, et al. LECT2, a ligand for Tie1, plays a crucial role in liver fibrogenesis[J].2019, 178(6): 1478-1492.[慢病毒,肝纤维化]

[02] Cell Metabolism.(IF=27.287).Lv H, Lv G, Chen C, et al. NAD⁺ metabolism maintains inducible PD-L1 expression to drive tumor immune evasion[J].2021, 33(1):110-127.[慢病毒过表达、干扰,肿瘤免疫,肝癌]

[03] Blood.(IF=22.113).Liu F, Gao Y, Xu B, et al. PEG10 amplification at 7q21.3 potentiates large-cell transformation in cutaneous T-cell lymphoma: PEG10 amplification potentiates LCT in CTCL[J]. 2021.[慢病毒干扰,淋巴瘤]

[04] Nature cell biology.(IF=17.728).Shen S M, Zhang C, Ge M K, et al. PTEN α and PTEN β promote carcinogenesis through WDR5 and H3K4 trimethylation[J].2019,21(11):1436-1448.[慢病毒过表达、Cas9/dCas9,甲基化,肝癌]

[05] Journal of hematology & oncology.(IF=17.388).Yang L, Chen Y, Liu N, et al. Low expression of TRAF3IP2-AS1 promotes progression of NONO-TFE3 translocation renal cell carcinoma by stimulating N6-methyladenosine of PARP1 mRNA and downregulating PTEN[J].2021,14(1):1-20.[慢病毒干扰,肾细胞癌]

[06] Autophagy.(IF=16.016).Wang B, Yin X, Gan W, et al. PRCC-TFE3 fusion-mediated PRKN/parkin-dependent mitophagy promotes cell survival and proliferation in PRCC-TFE3 translocation renal cell carcinoma[J].2021,17(9):2475-2493.[慢病毒过表达,肾细胞癌]

[07] Cell Death & Differentiation.(IF=15.828).Ji J, Ding K, Luo T, et al. TRIM22 activates NF- κ B signaling in glioblastoma by accelerating the degradation of I κ B α [J].2021,28(1): 367-381.[慢病毒过表达、Cas9,胶质瘤]

[08] Cell Death & Differentiation.(IF=15.828).Hou Y, Zhang Q, Pang W, et al. YTHDC1-mediated augmentation of miR-30d in repressing pancreatic tumorigenesis via attenuation of RUNX1-induced transcriptional activation of Warburg effect[J].2021:1-20.[慢病毒过表达,肿瘤代谢,胰腺癌]

[09] Nature communications.(IF=14.919).Song H, Song J, Cheng M, et al. METTL3-mediated m6A RNA methylation promotes the anti-tumour immunity of natural killer cells[J].2021, 12(1):1-15.[慢病毒干扰,肿瘤免疫NK细胞,肝癌]

[10] Gastric Cancer.(IF=7.370) Caiqi Ma, Chuanghua Luo,Haofan Yin,et al.Kallistatin inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of gastric cancer by downregulating VEGF-C expression and secretion[J].2018, 21(4):617-631.[慢病毒过表达, Luciferase,胃癌]

* 更多客户发表文章见操作手册或咨询业务员

※ 附录

APPENDIX

※ 载体元件介绍

1) 荧光蛋白:

荧光蛋白是一类可视化的报告基因编码蛋白，包括绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等。这类蛋白质在特定波长下可激发明亮荧光，可用于细胞或者体内观察感染效率等。需注意两个问题：

① 若荧光与目的基因融合表达，可用于检测目的蛋白的亚细胞定位，但是两个蛋白的空间结构可能会相互影响，如果只是为了观察感染效率，不建议做融合表达。

② 若后续需要做免疫荧光（多通道）或者流式检测等需要用到多荧光通道时，需注意荧光是否影响后续实验。

常用荧光列表

	Protein	Excitation Maximum (nm)	Emission Maximum (nm)	Length (aa)	Molecular Weight (kDa)
Blue Fluorescent Protein	EBFP2	383	448	239	26.4
Cyan Fluorescent Protein	ECFP	439	476	239	26.9
Green Fluorescent Proteins	Superfolder GFP	485	510	238	26.8
	EGFP	488	507	239	26.9
	mNeonGreen	506	517	236	26.7
Yellow Fluorescent Proteins	EYFP	514	527	239	27.0
	Venus	515	528	239	26.8
Orange Fluorescent Proteins	dTomato	554	518	234	27.0
	tdTomato	554	518	476	54.2
	DsRed2	563	582	235	25.8
Red Fluorescent Proteins	mScarlet	569	594	232	26.4
	mCherry	587	610	236	26.7
Near-infrared(NIR) Fluorescent Protein	iRFP	690	713	316	34.6

2) 抗性基因:

抗性基因即抗性的遗传因子，是选择基因的一种，属于标记基因。

主要分为原核抗性和真核抗性。

原核抗性主要用于原核生物的筛选，比如质粒转化，菌液扩增等过程；

真核抗性主要用于真核细胞的筛选，比如稳定株筛选的过程。

常用抗性基因使用的浓度筛选范围及药效持续时间如下，最终筛选范围及操作细节以实际购买抗生素的说明书为准。

抗性基因	筛选浓度范围	药效持续/筛选时间	常用品牌
Puromycin	1-10 µg/mL	2-3 d / 3-10 d	Amresco, J593
G418	100 - 1000 µg/mL	2-3 d / 3-4w	Amresco, E859
Gentamicin	0.5-50 µg/mL	2-3 d / 3-10 d	Gibco, R01510
Zeocin	50-400 µg/mL	3-4 d / 5-21d	Invivogen, ant-zn-1p
Hygromycin B	50-1000 µg/mL	3-4 d / 7-10 d	Merck, SBR00039
blasticidin	1-50 µg/mL	3-4 d / 7-14 d	Merck, SBR00022
Ampicillin	1µg/mL		Sigma, A5354
Kanamycin	1µg/mL		Sigma, E004000-5G

3) 标签:

标签 (Proteintag) 是指与目的蛋白一起融合表达的多肽或者蛋白，其用途一般为：便于目的蛋白的纯化，增加目的蛋白的可溶性表达和稳定性，或利于目的蛋白的检测和体内示踪等。其中大分子量增溶性融合蛋白如GST标签主要功能是提高靶蛋白的可溶性，促进靶蛋白正确折叠，提高稳定性，可用于GST等实验。

标签基因	氨基酸序列	常用品牌(用于WB检测)
His tag	(His) ₆	Sigma, SAB4301134
HA	YPYDVPDYA	Sigma, H6908
3×FLAG	(DYKDDDDK) ₃	Sigma, F1804
c-Myc	EQKLISEEDL	Sigma PLA0001
GST	211个氨基酸, 约26kDa	和元定制
OLLAS	SGFANELGPRLMGK	Thermo, MA5-16125

4) 连接元件

为了实现多基因协同表达，目前广泛采用多顺反子表达方案，即利用内部核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, IRES) 或自剪切多肽 2A (self-cleaving 2A peptide, 2A) 等元件来连接多个基因。

IRES 及 2A 的特点如下：

连接元件	大小	特点
IRES	0.6kb	用于连接两个基因同时表达，两个蛋白断裂较干净但是下游的基因表达较弱，如 gene-IRES-EGFP 中 EGFP 荧光表达会偏弱。
2A	约 60bp	用于连接两个基因同时表达，gene1-2A-gene2，蛋白水平会从 2A 的最后一个脯氨酸断开，断开后得到两个片段，gene1-2A 和 gene2，gene1-2A 可以用 2A 抗体做 WB 检测，gene2 的前面会多一个来自 2A 序列的脯氨酸。
独立表达两个基因时尽量采用两个启动子分别启动基因表达的策略，但是需要考虑病毒载体容量的问题。		

其他元件	大小	特点
WPRES	0.6kb	增加目的基因的表达，另外滴度检测的引物也设计在这一位置；为了增加病毒载体的承载容量可以酶切去掉（具体的载体是否方便去掉要具体分析），如果去掉要考虑滴度测定的 qPCR 引物问题，尽量保留 WPRES。在慢病毒载体设计中尽量不要去除，可能影响出毒。

※ 慢病毒感染细胞 MOI

细胞名称	中文名称	慢病毒感染 MOI
RT4	人膀胱移行细胞乳头瘤细胞	40
BHK-21 [C-13]	仓鼠肾成纤维细胞	80
H9c2(2-1)	大鼠心肌细胞	10
PC-12(高分化)	大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(高分化)	20
MDCK(NBL-2)	狗肾细胞	40
B16-F10	小鼠皮肤黑色素瘤细胞	10
Beta-TC-6	小鼠胰岛素瘤胰岛β细胞	20-40
Neuro-2a	小鼠脑神经瘤细胞	40-80
3T3-L1	小鼠胚胎成纤维细胞	100
HT-1080	人纤维肉瘤	40
FaDu	人咽喉癌细胞	10
TE-1	人食管癌细胞	20
NCI-N87	人胃癌细胞	40



细胞名称	中文名称	慢病毒感染MOI
MGC80-3	人胃癌细胞	10
AGS	人胃癌癌细胞	20-40
SGC-7901	人胃腺癌细胞	40-80
BGC-823	人胃腺癌细胞（低分化）	80
Hep G2	人肝癌细胞	20
HuH-7	人肝癌细胞	10
PANC-1	人胰腺癌细胞	10
BxPC-3	人原位胰腺腺癌细胞	20-40
AsPC-1	人转移胰腺腺癌细胞	40
COLO 205	人结肠癌细胞	40
HCT-116	人结肠癌细胞	20-40
HT-29	人结肠癌细胞	20-40
LoVo	人结肠癌细胞	80
SW480	人结肠腺癌细胞	10
LS 174T	人结肠腺癌细胞	80
RKO	人结肠腺癌细胞	10
HCT-15	人结直肠腺癌细胞	80
786-O [786-0]	人肾透明细胞腺癌细胞	20
Caki-1	人肾透明细胞癌皮肤转移细胞	10
ACHN	人肾细胞腺癌细胞	10
5637	人膀胱癌细胞	40
SV-HUC-1	人输尿管上皮永生化细胞	80
T24	人膀胱移行细胞癌细胞	20-40
SW 780	人膀胱移行细胞癌	100
J82	人膀胱移行细胞癌	40
UM-UC-3	人膀胱移行细胞癌	40-80
U-118 MG	人脑星形胶质母细胞瘤	10
RWPE-1	人正常前列腺上皮细胞	20
DU 145	人前列腺癌细胞	20-40
HeLa	人宫颈癌细胞	10-20
SiHa	人子宫颈鳞癌细胞	80
Ca Ski	人宫颈腺癌转移细胞	10
SK-OV-3	人卵巢癌细胞	20-40
ES-2	人卵巢透明细胞癌	20
MCF7 [MCF-7]	人乳腺癌细胞	10
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	40-80
MDA-MB-468	人乳腺癌细胞	40
ZR-75-1	人乳腺癌细胞	10
MDA-MB-435S	人乳腺导管癌	40
BT-549	人乳腺导管癌细胞	20



细胞名称	中文名称	慢病毒感染MOI
A549	人非小细胞肺癌细胞	40
NCI-H1650	人非小细胞肺癌细胞	40
NCI-H292	人肺癌细胞(淋巴结转移)	40
Calu-3	人肺腺癌(胸水)	100
NCI-H1975	人肺腺癌细胞	10-20
NCI-H1299	人非小细胞肺癌细胞	10-20
SW 1353	人软骨肉瘤细胞	10
U-2 OS	人骨肉瘤细胞	10-20
U-87 MG	人脑星形胶质母细胞瘤	10
SK-N-SH	人神经母细胞瘤细胞	20-40
U251	人胶质瘤细胞	10
A172	人胶质母细胞瘤细胞	10
Raji	人Burkitt's淋巴瘤细胞	80
Jurkat, Clone E6-1	人T淋巴细胞白血病细胞	20-60
K-562	人慢性髓原白血病细胞	10
208F	大鼠成纤维细胞	20
B16-F0	小鼠黑色素瘤细胞	80
GES-1	人胃上皮细胞	20
Hepa1-6	小鼠肝癌细胞	20
MKN-45	人胃癌细胞	20
Tca-8113	人舌鳞癌细胞	40
EJ	人膀胱癌细胞	40
CAL 27	人舌鳞癌细胞	20
LLC1[LL/2]	小鼠Lewis肺癌细胞	40
PC14	人肺癌细胞	10
MADB-106	大鼠乳腺癌细胞	20
PK (15)	猪肾上皮细胞	20
MARC145	猴胚胎肾上皮细胞	40
CNE	人鼻咽癌细胞	40-80(CNE-1)
F98	大鼠脑胶质瘤细胞	20
P9	小鼠骨髓基质细胞	40
Mia PaCa-2	人胰腺癌细胞	10
MHCC-97H	人肝癌细胞(高转移)	10-20
HCC-LM3	人高转移肝癌细胞	20
BV2	小鼠小胶质细胞	80
OVCAR-3	人卵巢癌细胞	20-40
NIH3T3	小鼠胚胎成纤维细胞	40-80
CT26.WT	小鼠结肠癌细胞	100
Jurkat	人T淋巴细胞白血病细胞	60
B-CPAP	人甲状腺癌细胞B-CPAP	10-40

细胞名称	中文名称	慢病毒感染MOI
HOS	人骨肉瘤细胞	10
NCM-460	人正常结肠上皮细胞	20
Capan-2	人胰腺癌细胞	10
THP-1	人单核细胞白血病	40-80
SMMC 7721	人肝癌细胞	40
TF-1	人红白血病细胞	10
SW620	人结肠腺癌细胞	10
HCC827	人非小细胞肺癌细胞	10
NCI-H460 [H460]	人大细胞肺癌细胞	40
HGC-27	人胃癌细胞 (未分化)	20
Hep3B	人肝癌细胞	10
ID8	小鼠卵巢癌细胞	20

※ 病毒感染检测时间 (仅供参考, 具体以实际结果为准)

产品类型	起效时间	持续时间	检测时间
质粒	1-3天	2-3天可能达到表达高峰, 持续时间1周左右	2-3天
慢病毒 (Lentivirus, LV)	体外2-3天	3天左右可能达到表达高峰, 持续时间1个月以上	2-3天以上
	体内2-3天	3天左右可能达到表达高峰, 持续时间1个月以上	2-3天以上
腺病毒 (Adenovirus, ADV)	体外1-3天	2-3天可能达到表达高峰, 持续时间2周左右	2-3天以上
	体内1-3天	3天左右可能达到表达高峰, 持续时间2周左右	2-3天以上
腺相关病毒 (单链AAV即ssAAV)	体外1~3天	3天左右可能达到表达高峰	2-3天以上
	体内2-3周	3周左右到达表达高峰期, 持续时间3个月以上, 神经系统可能更长	3周以上
腺相关病毒 (双链AAV即scAAV)	体外1-3天	3天左右可能达到表达高峰	2-3天以上
	体内1-3天	3天左右到达表达高峰期, 持续时间目前肝脏观察到42天没有问题, 可能更长	2-3天以上
逆转录病毒 (Retrovirus, ROV)	体外2-3天	3天左右可能达到表达高峰, 持续时间1个月以上	2-3天以上
	体内2-3天	3天左右可能达到表达高峰, 持续时间1个月以上	2-3天以上
siRNA	6h	2~3天	FAM观察时间建议转染后6h左右, mRNA水平或者蛋白水平检测建议2~3天左右

※ 售后标准

类型	售后标准	售后数据
过表达-编码蛋白	<p>① 保证目的基因构建的序列正确性；</p> <p>② 过表达效果：工具细胞或者目的细胞中，感染/转染效率70%以上（或者使用真核抗性筛选富集细胞），且空细胞内参CT值15左右，目的基因CT值高于20（本底表达不高）时，若目的基因融合了标签，保证标签抗体能检测到条带； 若目的基因无融合标签，保证mRNA水平过表达组比对照组（qPCR检测方法）过表达10倍以上；</p>	<p>① 细胞名称，感染/转染图片；</p> <p>② 分组：空，对照组，目的组</p> <p>③ qPCR引物及qPCR检测的原始数据/标签抗体WB检测结果（WB检测结果需带上抗体的阳性样本组）</p>
过表达-lncRNA	<p>① 保证目的基因构建的序列正确性；</p> <p>② 过表达效果：工具细胞或者目的细胞中，感染/转染效率70%以上（或使用抗性筛选后收样），且空细胞内参CT值15左右，目的基因CT值高于20（本底表达不高）时， 保证mRNA水平过表达组比对照组（qPCR检测方法）过表达10倍以上；</p>	<p>① 细胞名称，感染/转染图片；</p> <p>② 分组：空细胞，对照组，目的组</p> <p>③ qPCR引物及qPCR检测的原始数据</p>
过表达-miRNA	<p>① 保证目的基因构建的序列正确性；</p> <p>② 因外源miRNA进入细胞或体内后的成熟机制较为复杂，无法保证miRNA过表达效果</p>	<p>建议miRNA的表达检测使用成熟试剂盒引物进行检测。</p>
过表达-circRNA	<p>① 保证目的基因构建的序列正确性；</p> <p>② 因外源circRNA进入细胞或体内后的成环机制较为复杂，无法保证circRNA过表达效果</p>	
干扰-编码蛋白/lncRNA-全套-广谱启动子	<p>① 保证目的基因构建的序列正确性；因shRNA的发卡结构可能导致测序中断，若测序中断，则提供两个独立克隆测序中断的测序报告；</p> <p>② 转染或者感染效率在70%以上（或者使用真核抗性筛选富集细胞），且空细胞内参CT值15左右，目的基因CT值低于28（本底不低），mRNA水平（qPCR检测方法）若3条靶点干扰效果均没有到70%以上，则可以免费再构建2条，若新构建的2个靶点还是无效，则表明目的基因可能较难敲减。</p>	<p>① 感染/转染图片；</p> <p>② 分组：空细胞，NC对照组，干扰目的组1，干扰目的组2，干扰目的组</p> <p>③ qPCR引物及qPCR检测的原始数据</p>
干扰-编码蛋白/lncRNA-全套-特异性启动子	<p>① 保证目的基因构建的序列正确性；因shRNA的发卡结构可能导致测序中断，若测序中断，则提供两个独立克隆测序中断的测序报告；</p> <p>② 由于特异性启动子只在特定细胞中表达，取材无法避免去掉不表达部分的组织，因此建议切片原位检测干扰效果，使用原位杂交或者免疫荧光的方法进行检测，若3条靶点干扰效果均没有到70%以上，则可以免费再构建2条，无论新构建的2个靶点是否有干扰效果，不再进行售后。</p>	<p>① 感染/转染图片；</p> <p>② 分组：空细胞，NC对照组，干扰目的组1，干扰目的组2，干扰目的组3，切片原位杂交或者免疫荧光图片</p>

类型	售后标准	售后数据
干扰-编码蛋白/lncRNA/circRNA-客供靶点	① 保证目的基因构建的序列正确性；因shRNA的发卡结构可能导致测序中断，若测序中断，则提供两个独立克隆测序中断的测序报告； ② 因靶点为甲方提供，无法对干扰效果做保证。	
干扰- circRNA -全套	① 保证目的基因构建的序列正确性；因shRNA的发卡结构可能导致测序中断，若测序中断，则提供两个独立克隆测序中断的测序报告； ② 由于circRNA的干扰靶点需要跨接头处设计，因此可设计靶点较少，无法进行3+2售后；	
封闭-miRNA	① 保证目的基因构建的序列正确性； ② 由于目前miRNA的封闭方法均为竞争性吸附的原理，miRNA序列可能还存在于细胞中，qPCR的方法直接检测可能检测不到封闭效果，因此无法对封闭效果做保证。	



全国服务热线：400-151-5198

温馨提示：

- ① 本手册仅供科研参考使用，不作为实验指导SOP。
- ② 本手册中有【注】的内容，是对所述内容的补充，阅读时需关注。
- ③ 初次使用或接触慢病毒的科研人员，请仔细阅读本手册，以便于更好的理解慢病毒载体作为科研工具的使用方法。



和元生物技术(上海)股份有限公司 (证券代码:688238)

电话: 400-151-5198 021-5858 5887

邮箱: oobio@obiosh.com

官网: www.obiosh.com

地址: 上海市浦东新区国际医学园区紫萍路908弄19号楼