

☎ 400-077-2566
🌐 WWW.VIGENEBIO.CN



维真(Vigene)生物科技有限公司

· 美国 ·

马里兰州罗克维尔基韦斯特大街9430号

Web: www.vigenebio.com

TEL: 301-251-6638

· 中国 ·

济南市高新区港源四路416号维真产业园

网址: www.vigenebio.cn

技术交流QQ群: 290156365 企业客服QQ: 4000772566

邮箱: service@vigenebio.com.cn



慢病毒 Lentivirus

Technical Manual
技术手册



维真生物 (Vigenebio) 公司于 2012 年分别在美国马里兰州和中国济南创立, 注册资金 1 亿元, 规划总建筑面积达 3 万平米。维真生物公司定位于生物与健康企业, 专注于科研级和临床级慢病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的研发生产。

目前, 公司已拥有包含 18000 个人源 ORF 克隆的现货质粒库和包含 12000 个人源 ORF 的腺病毒现货库。此外, 公司还可提供载体构建、基因敲除、基因突变, 并在此基础上向全球客户提供各类病毒包装等服务。我们的客户遍及中国、美国、欧洲等各大院校、科研院所、医院及高科技生物企业。

在“让生命更健康, 让世界更美好”伟大愿景的指引下, 维真生物将专心服务每一位客户, 以帮助客户解决问题为目标, 以专业的服务共创未来。

VIGENEBIO 维真生物

| 载体构建 | 腺病毒 | 慢病毒 | 腺相关病毒 |

目录

产品简介	01
生产与检测	03
使用案例分享	13
常见问题解答	20
产品分类	21
专题讨论	23
运输 & 储存	28
部分客户代表性文章	29
安全操作规范与免责声明	31
维真产品与服务	32

CONTENTS

Vigenebio

慢病毒

产品简介

慢病毒属于逆转录病毒科，是一种单链RNA病毒，是以人类免疫缺陷I型病毒为基础发展起来的基因治疗载体。慢病毒载体区别于一般的逆转录病毒载体，对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力，并能整合到宿主基因组上实现长期稳定的表达，是体外和体内基因传递的有效工具。

Vigene慢病毒载体具有各种标签和荧光标记，大部分慢病毒载体都具有与 pEnter穿梭载体相同的MCS多克隆位点及筛选标记。外源ORF可通过简单的“剪切和粘贴”的克隆方法，从pEnter载体转移到慢病毒载体上。



慢病毒 基因传递和表达的 优势

- **宿主范围广**：不仅感染分裂细胞，还可感染非分裂细胞；能有效感染原代细胞、神经元细胞、干细胞、心肌细胞、内皮细胞、肝细胞、肿瘤细胞等；
- **表达时间长**：具有整合特性，能够长久表达，适于构建稳转株；
- **免疫反应小**：注射动物基本不会造成免疫反应，适于体内实验；
- **安全性高**：删除了 HIV 编码基因，且未发现致肿瘤活性，安全的基因治疗载体；

慢病毒 基因传递和表达的 劣势

- **包装容量有限**：插入的外源基因序列需在 4kb 以下；
- **包装滴度较低**：相比腺病毒与腺相关病毒，慢病毒包装滴度稍低；



Vigenebio

慢病毒

生产与检测

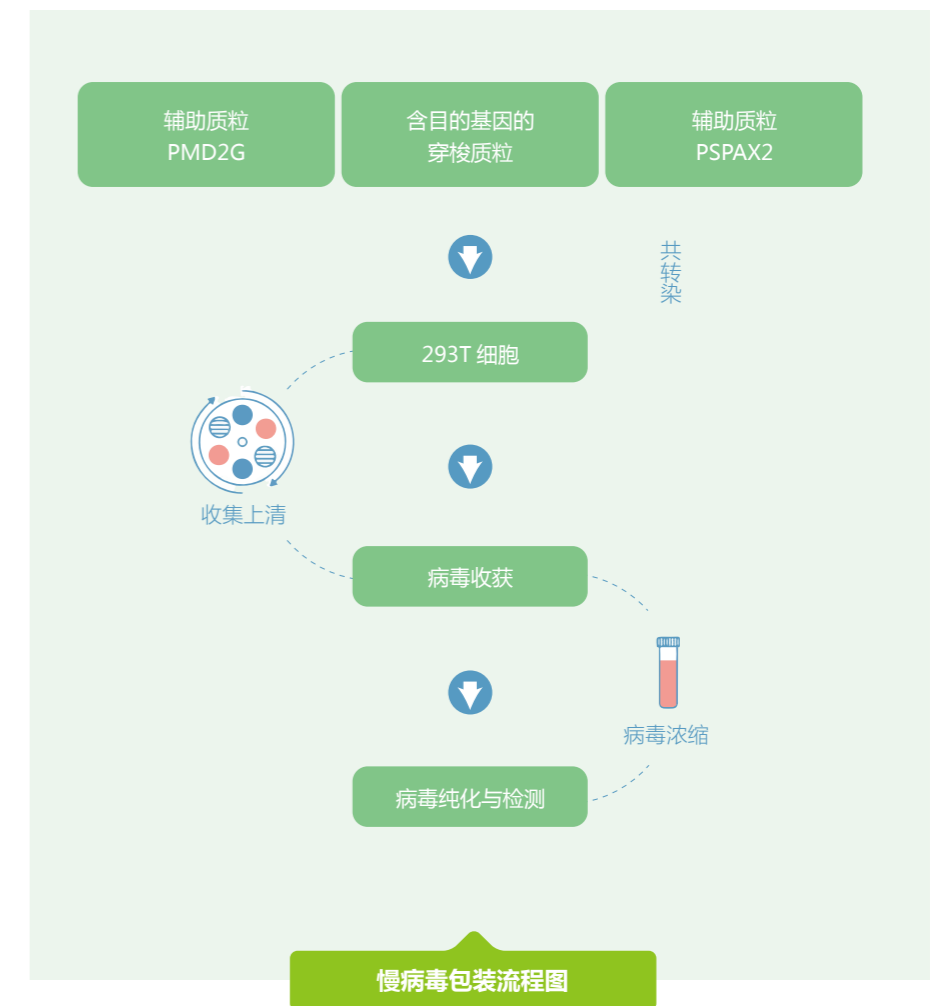
- 第一步 慢病毒载体构建
- 第二步 慢病毒包装
- 第三步 慢病毒滴度测定
- 第四步 慢病毒感染细胞预实验
- 第五步 慢病毒感染细胞实验



1. 慢病毒载体构建

将 ORF 片段从 pENTER 穿梭载体转移至慢病毒载体

使用 Vigene 的 ORF 穿梭质粒系统，只需短短的两天时间，便可简单地将 ORF 片段从 pENTER 载体转移到任何慢病毒载体。



2. 慢病毒包装流程

1. 第一天：

将 HEK293T 细胞铺于 10cm 盘，使次日细胞融合度约 85%-90%；

2. 第二天：

按照以下比例配制转染试剂，混匀后室温静置 3min，后加入 PEI 涡旋混匀，室温静置 30min，加至 10cm 细胞培养皿中，转染后 6h 更换新鲜培养基（以二代为例）。

	Mix1	体积 μL
1	DMEM(无 FBS)	1000 μL
2	目的基因质粒	10 μg
3	PMD2G	3 μg
4	PSPAX2	6 μg

3. 第三天：

观察转染效率并拍照；

4. 第五天：

- 转染后 72h 收取上清培养基，过 0.45 μm 滤膜；
- 将过滤后的上清培养基加入超速离心管中离心，25000rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1.5h；
- 弃上清，用适当病毒保存液涡旋 30s 混匀，溶解置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

5. 第六天：

收集病毒分装，进行病毒滴度测定和特异性检测；

3. 慢病毒滴度测定

1. 含荧光标记慢病毒的 TU 测定

Vigene 慢病毒单位为 TU/mL，即每毫升中含有的具有生物活性的病毒颗粒数。如：病毒滴度为

$>1 \times 10^8$ TU/mL 即每毫升病毒液中至少含有 1×10^8 个具有生物活性的慢病毒颗粒。

慢病毒的病毒滴度 (TU/mL) 可根据荧光蛋白在 HEK293 细胞中表达量确定，具体操作步骤如下：

第一天 细胞的准备

在 96 孔板中的每个孔中接种 $1-4 \times 10^4$ 个 HEK293 细胞。

第二天 病毒的稀释和感染

在 Eppendorf 管中做 10 倍梯度稀释。稀释方法为：每种病毒准备 8 个 1.5mL Eppendorf 管，每管加入 297 μL 完全培养液，向第一个管中加入 33 μL 病毒原液，混匀后，吸取 30 μL 加入第二个管混匀。依此类推，做 8 个稀释度 ($10 \sim 10E-6$)。弃去 96 孔板中原有的培养液，每个稀释度重复 3 个孔，每孔加入含稀释好的病毒液 100 μL 。并做好标记。

实验预览如图：

	1	2	3
A	10 $\mu\text{L}/\text{well}$	10	10
B	10^0	10^0	10^0
C	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
D	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}
E	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
F	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}
G	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
H	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}

第五天 荧光计数和滴度计算

用荧光显微镜对荧光阳性细胞进行计数。数出最后两个能观察到荧光的孔内的荧光细胞数，计算 3 个重复孔内的总数之和并计算出平均数，假设为 A（倒数第二个能见荧光孔的荧光细胞平均数）和 B（倒数第一个能见荧光孔的荧光细胞平均数）。

慢病毒滴度计算公式：

$$\text{病毒滴度 (TU/mL)} = (A + B \times 10) \times 1000 / 2 / A \text{ 孔病毒量 } (\mu\text{L})$$

2. 慢病毒 IU 的检测

○ 病毒感染细胞

- 感染前 6 h 在 24 孔细胞培养板中以 2.5×10^5 个细胞 / 孔 均匀接种 HEK293 细胞。
- 将慢病毒进行梯度稀释,共做 3 个梯度,即每孔 (500 μ L 无双抗、无血清的 DMEM 培养基) 中含 10 μ L、1 μ L、0.1 μ L 病毒,涡旋混匀后加至接种好细胞的 24 孔板中,加病毒之前将培养板中的培养基吸净。
- 感染 18-20 h 后,将培养板中的培养基更换为新鲜的 DMEM 完全培养基。
- 感染 64-68 h 后收集细胞并进行基因组 DNA 的提取。
- 设置一组带荧光的已知 TU 的慢病毒作为对照,以核对检测出的数值。

○ 提取基因组 DNA (按照 AxyGEN 的基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作)

○ qPCR 检测

- 以被测慢病毒载体梯度稀释为标准品,慢病毒载体上的通用引物进行 qPCR 以获得病毒整合拷贝数。
- 以 Actin 质粒梯度稀释为标准品,Actin 引物进行 qPCR 检测样品的基因组拷贝数以得到基因组拷贝数。
- SYBR 法相对定量 PCR 反应体系及参数

模板	2 μ L
2 \times SYBR mix	10 μ L
上游引物 (10 μ M)	0.4 μ L
下游引物 (10 μ M)	0.4 μ L
补水至 20 μ L	

○ 计算慢病毒 IU (Integration Unit) ml⁻¹

$$IU \text{ ml}^{-1} = (C \times N \times D \times 1000) / V$$

C= 平均每基因组慢病毒整合拷贝数
 N= 感染时细胞的数目 (约为 2.5×10^5)
 V= 加入稀释病毒的体积数
 D= 病毒的稀释倍数

4. 特异性检测方法

○ 1. 慢病毒样品预处理

- 感染慢病毒的细胞吹下后转移到 EP 管中, 12000rpm 离心 2min, 去上清;
 - 用裂解液裂解细胞, 吹打混匀, 使细胞充分裂解;
 - 冰上静置 30min, 然后 12000rpm 离心 10min;
 - 取上清, 用蛋白酶 K 处理 (如下)
- 在管上做好标记, 依次加入以下成分:

超纯水 (DNase & RNase Free)	8 μ L
蛋白酶 K (5 μ g/ μ l)	2 μ L
病毒原液	10 μ L
Total	20 μ L

盖好盖子, 震荡混匀并离心;

在 PCR 仪中进行以下程序:

37 $^{\circ}$ C	30min
95 $^{\circ}$ C	5min (灭活蛋白酶 K)

○ 2. PCR 程序结束后, 12000rpm, 离心 2min; 取上清转入新的 EP 管进行以下操作。

○ 3. 特异性检测 (引物分别有特异性引物与通用引物, 两者 PCR 体系一样)

反应体系:

以步骤 2 中所得上清为模板	1.5 μ L
2 \times Mix	10 μ L
Primer (Forward & Reverse mixture)	4 μ L
超纯水 (DNase & RNase Free)	4.5 μ L
Total	20 μ L

以下情况需用高GC体系

- A.shRNA的样品；
- B.在确认引物没有用错的前提下，用上述所示反应体系未扩增出条带的；
- C.不是shRNA但是模板中GC含量高的也需要用高GC体系做特异性检测；

高GC体系为：

以步骤2中所得上清为模板	1μL
Primer (Forward & Reverse mixture)	2μL
超纯水 (DNase & RNase Free)	8μL
Betaine	4.4μL
phusion	0.2μL
10mM High Pure dNTPs	0.4μL
5X GC Buffer	4μL
Total	20μL

4. PCR 反应程序 (72°C延伸时间需根据 DNA 大小确定)

98°C	4min	} 1 cycle
98°C	30sec	
64°C	30sec	
72°C	1min	

98°C	30sec	} 1 cycle
62°C	30sec	
72°C	1min	

98°C	30sec	} 1 cycle
60°C	30sec	
72°C	1min	
98°C	30sec	} 33 cycles
58°C	30sec	
72°C	1min	
72°C	10min ; 4°C保存	

5. 结果分析

PCR产物跑胶，扫胶，比对条带大小：

用特异性引物可得到条带，并且大小基本等于理论值，即可认为特异性正确；

没有特异性引物，或者用特异性引物进行PCR不能得到目的条带，则用通用引物PCR，得到产物送测序；

所有shRNA的病毒特异性均需测序验证。



严密的 生产流程
严格的 质控标准

✓ 质粒
✓ 慢病毒
✓ 腺病毒
✓ AAV

5. 慢病毒感染目的细胞预实验

不同的细胞所使用的病毒MOI值会有所不同。建议在正式实验前，在目的细胞中进行预实验摸索最佳MOI值。为了节省病毒，推荐使用96孔板进行预实验。操作步骤如下：

1. 第一天 细胞的准备

将目的细胞接种于96孔板中，细胞融合率50%为佳。为保证细胞生长良好，请保证细胞贴壁过夜。

2. 第二天 病毒的稀释

取10 μ L慢病毒原液加入90 μ L培养液中做1:10稀释（ 10^{-1} ），以此为起点做梯度稀释直至稀释 10^{-7} 。可根据实际情况降低或提高稀释倍数。

3. 第二天 感染目的细胞

取出提前准备好的96孔板，用准备好的病毒稀释液替代旧培养液，注意保留未加入病毒的细胞孔作为对照组。

4. 第二至十天 观察荧光或检测

慢病毒对细胞的感染较慢，请在感染细胞后48、72、96、120小时分别观察细胞中荧光表达情况（如果您选择的产品不带有荧光标签，请在48、72、96、120小时分别收获细胞并通过Western-Blot或其他检测手段来检测基因表达）。

注意事项：由于不同细胞对慢病毒感染过程的承受能力不同，在加入病毒稀释液后，请于12-24小时后观察细胞状态以确认加入的病毒量是否合适。

6. 慢病毒感染目的细胞实验

进行慢病毒感染实验时可使用完全培养液（培养目的细胞用）稀释。培养液中的血清、双抗或其他营养因子不会影响慢病毒的感染效率。

以24孔培养板为例，进行HEK293细胞的感染实验操作步骤如下：

注意事项：

实验前请按照不同的MOI设置不同的感染孔，并根据MOI和细胞数量计算所需要的病毒量。

1. 第一天 细胞的准备

在24孔培养板接种若干孔，每个孔内接种 $3-5 \times 10^4$ 个HEK293细胞，铺板时细胞的融合率为50%左右，每孔培养液体积为300 μ L，进行病毒感染时细胞的融合率约为70%左右。

2. 第二天 病毒的准备

根据实验的实际情况和MOI值，用培养液准确稀释慢病毒原液。

注意事项：可使用PBS缓冲液或无血清培养液稀释病毒原液。

3. 第二天 感染目的细胞

在目的细胞和对照细胞中分别加入计算好的病毒液，混匀后放于二氧化碳培养箱（37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ ）孵育过夜。

注意事项：

- 1) 感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果影响很大，请务必保证加入病毒前，细胞处于良好的生长状态。
- 2) 若慢病毒对目的细胞的感染效率较低，可通过提高MOI值提高病毒的感染效率，也可在培养液中加入助感染试剂ADV-HR来提高病毒的感染效率。

4. 第三天 更换培养液

病毒感染细胞24小时后，更换培养液。

注意事项：换液具体时间需视细胞状态而定。如果慢病毒对细胞有明显毒性作用，影响细胞生长状态，建议可于加病毒4小时后更换新鲜培养液后继续培养。

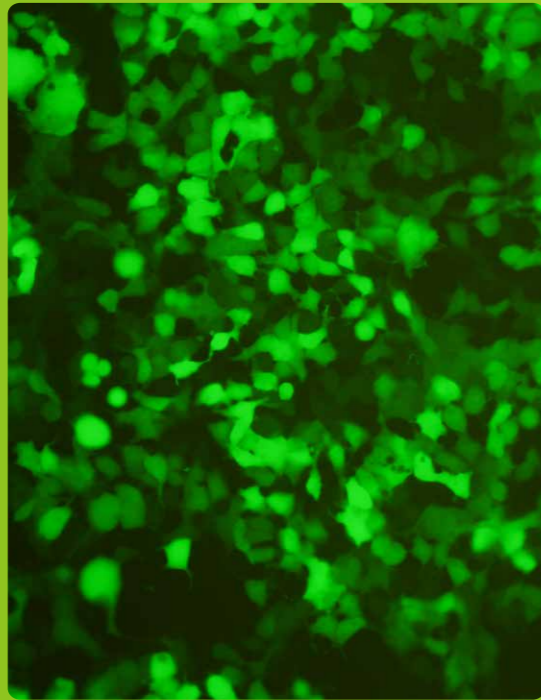
5. 第六天 感染效率检测

在倒置荧光显微镜观察荧光，计算慢病毒感染目的细胞的效率。如选择的慢病毒载体不带有荧光标记，可以通过Q-PCR(定量PCR)检测目的基因的表达来评估感染效率。

注意事项：

- 1) 慢病毒表达较慢，荧光表达所需时间较长，建议感染72-96小时后观察荧光的表达。
- 2) 感染后的细胞可以连续培养一周，通过观察荧光表达的时间和强度来确定慢病毒对目的细胞的感染情况。
- 3) 感染期间，请根据细胞生长的情况及时换液，以保证细胞良好的生长状态。

慢病毒 使用案例分享

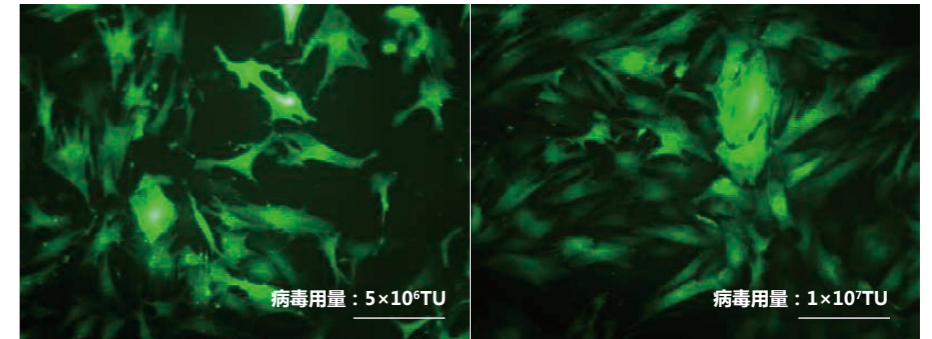


Vigene 慢病毒感染 HEK293 细胞

载体构建 | 腺病毒 | 慢病毒 | 腺相关病毒

注：部分为行业优秀案例分享，并未使用维真生物产品，在此仅供参考。

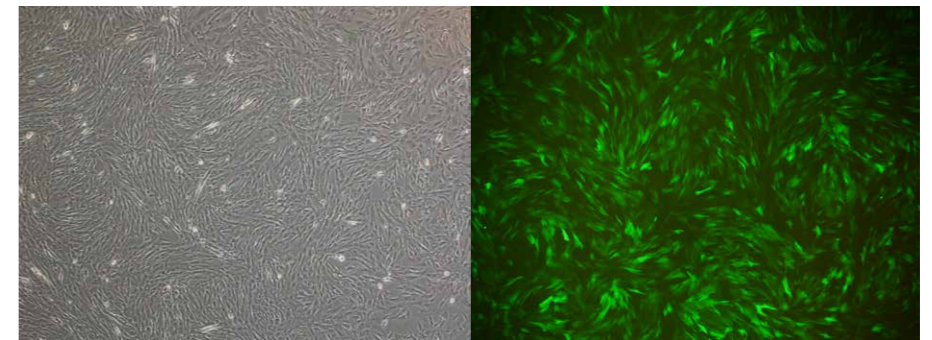
2. Vigene GFP 慢病毒感染牛脂肪细胞



病毒用量：5×10⁶TU

病毒用量：1×10⁷TU

3. Vigene 慢病毒感染大鼠血管平滑肌细胞



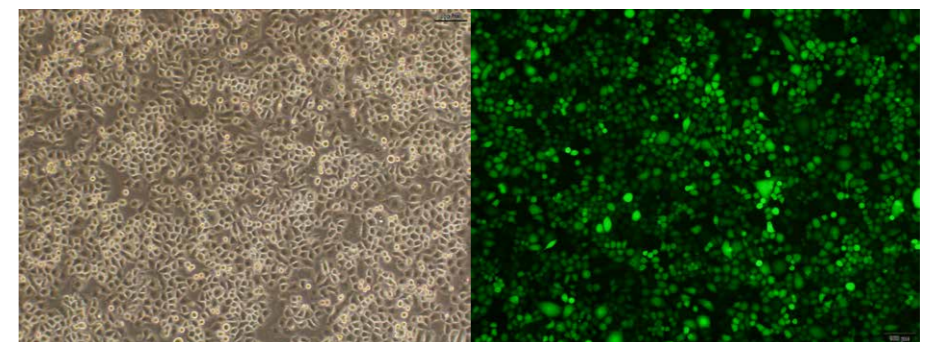
细胞类型：原代大鼠血管平滑肌细胞

MOI：100

检测时间：感染后 48h 拍摄

4. Vigene 慢病毒构建稳转株成功案例

mc-4 稳转株



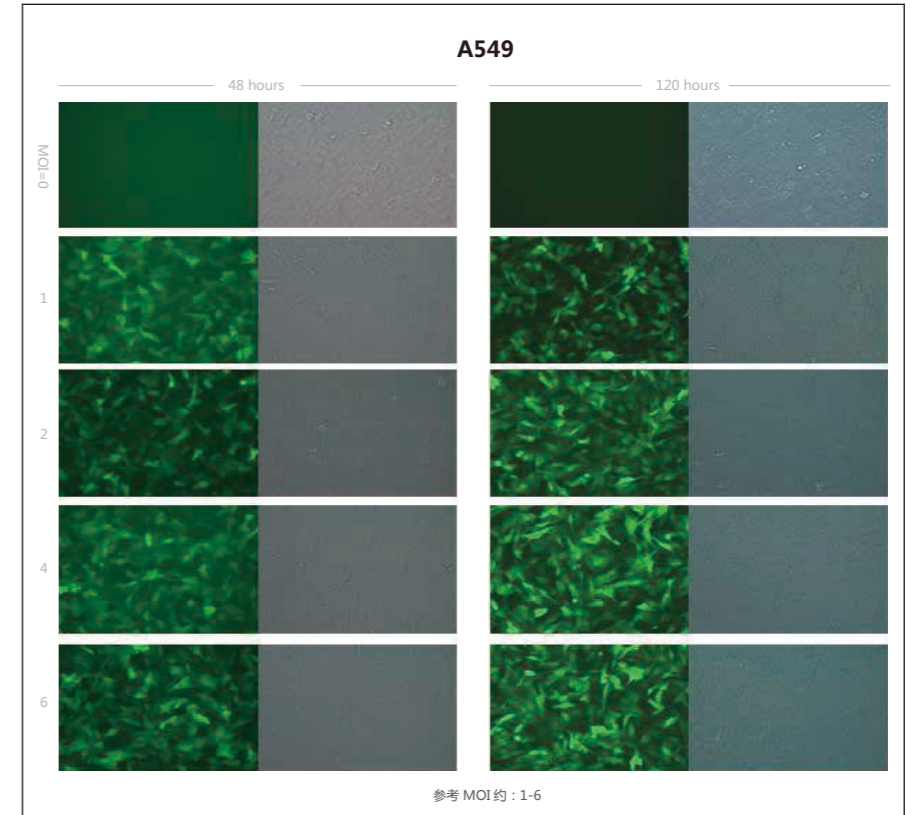
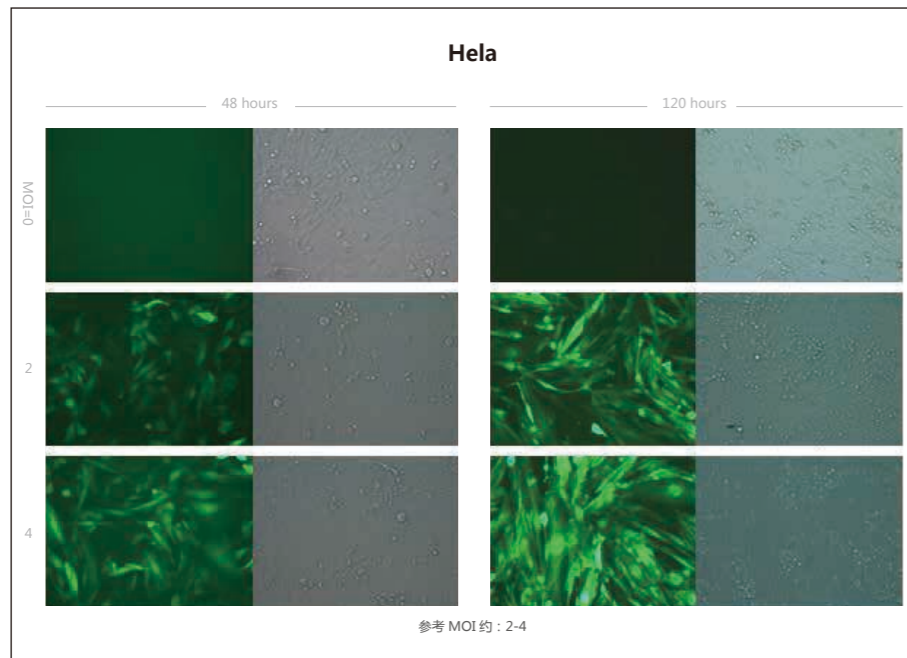
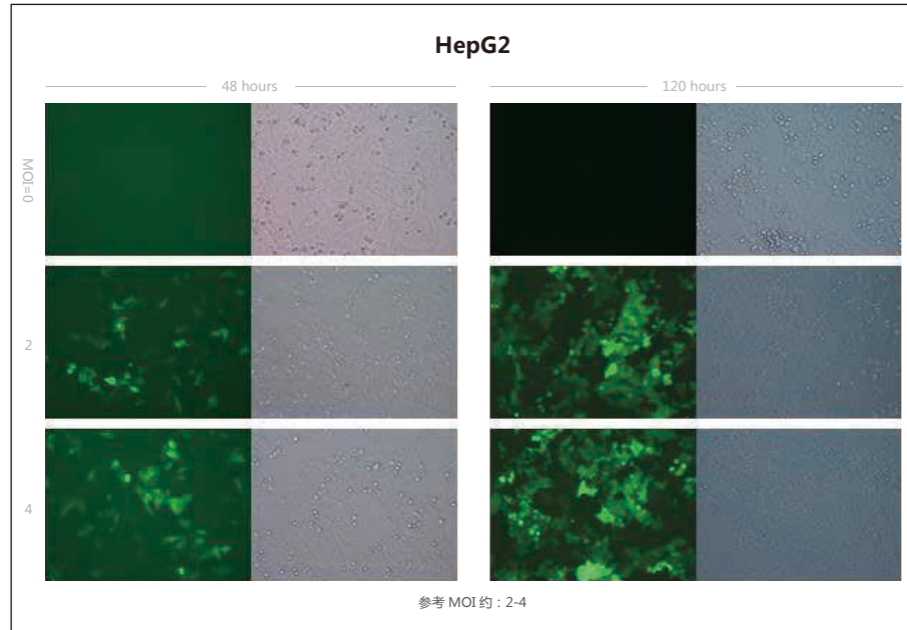
产品：维真 shRNA 慢病毒

抗性：嘌呤霉素

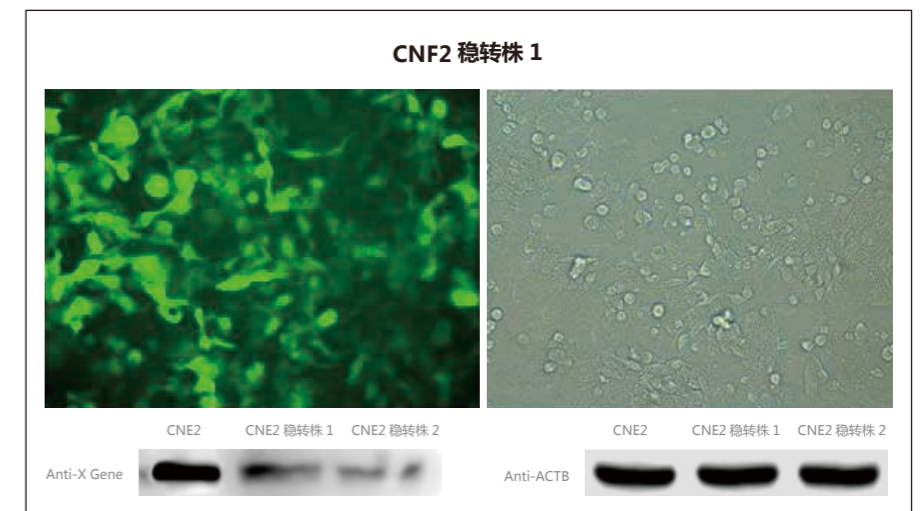
筛选周期：三周

5. Vigene 慢病毒在 HepG2、A549 和 HeLa 细胞中的 MOI 参考值

因慢病毒种类、实验条件、细胞状态、实验人员熟练程度等的不同，以下 MOI 仅供参考。务必于实验前进行 MOI 摸索预实验。



6. Vigene 慢病毒 (shRNA) 构建稳转株成功案例

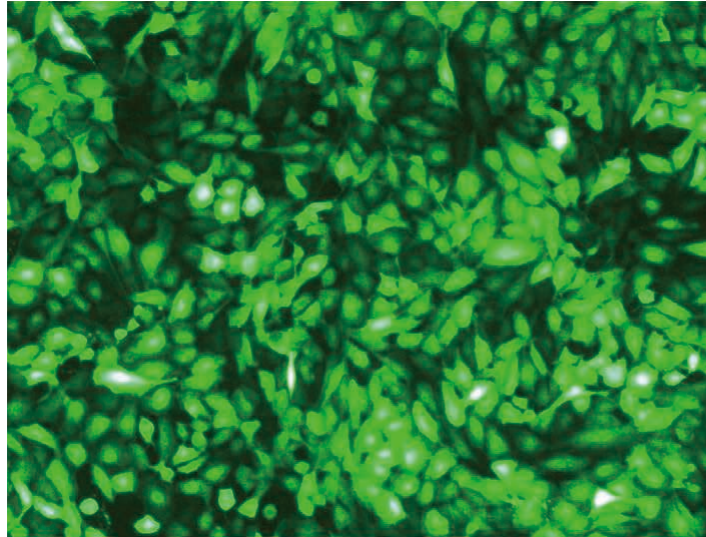


shRNA 载体：pLent-U6-GFP

抗性：嘌呤霉素 (Puromycin)

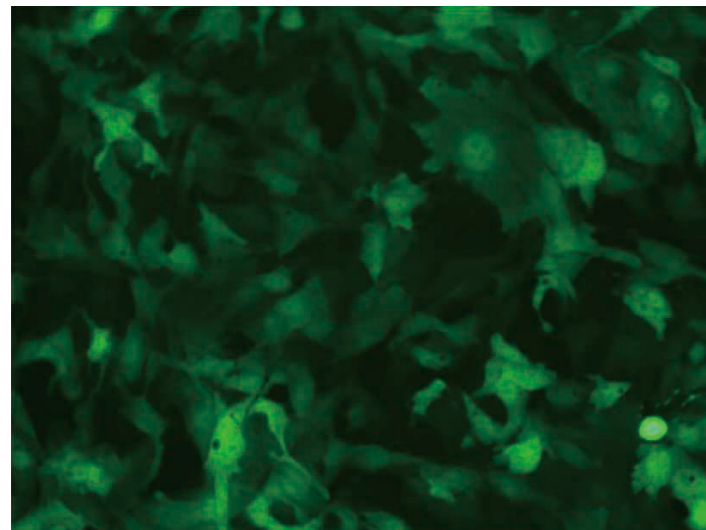
筛选周期：三周

7. shRNA 慢病毒感染人支气管上皮细胞



目的细胞：HBE 细胞（人支气管上皮细胞） 病毒滴度： 2.0×10^8 TU/mL
病毒用量：20uL（24 孔板） 使用效果：感染效率非常高，接近 100%

8. shRNA 慢病毒感染人上皮细胞



病毒用量：40uL(24 孔板) MOI=20 检测时间：感染 48h 后观察荧光
使用效果：感染效果达 90% 以上

高滴度

高达 1×10^8 TU/mL

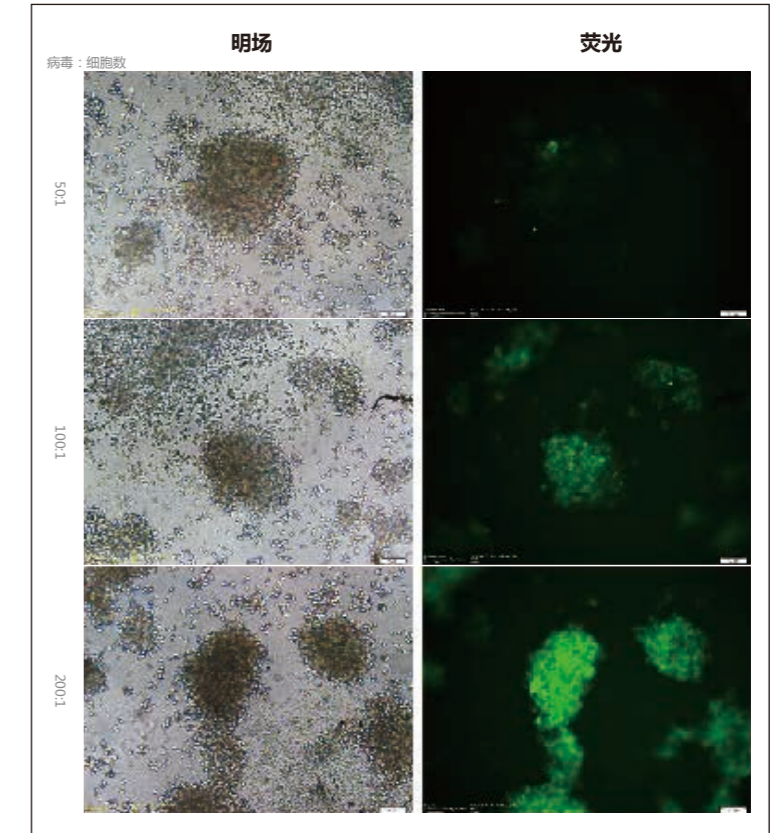
载体全

30 余种可供选择

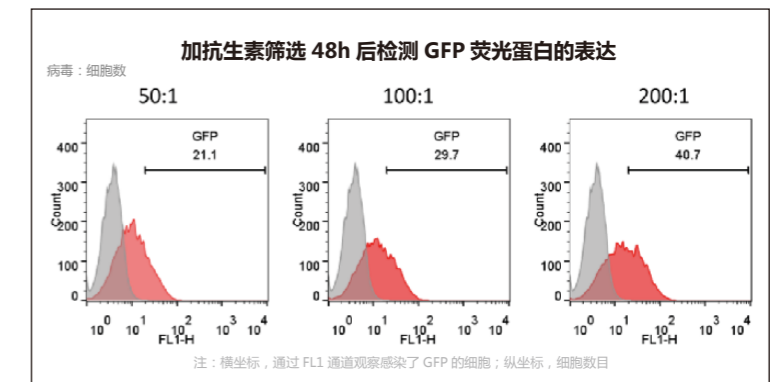


9. GFP 慢病毒感染人自然杀伤细胞 NK92

① 24 h 时检测 GFP 荧光蛋白的表达

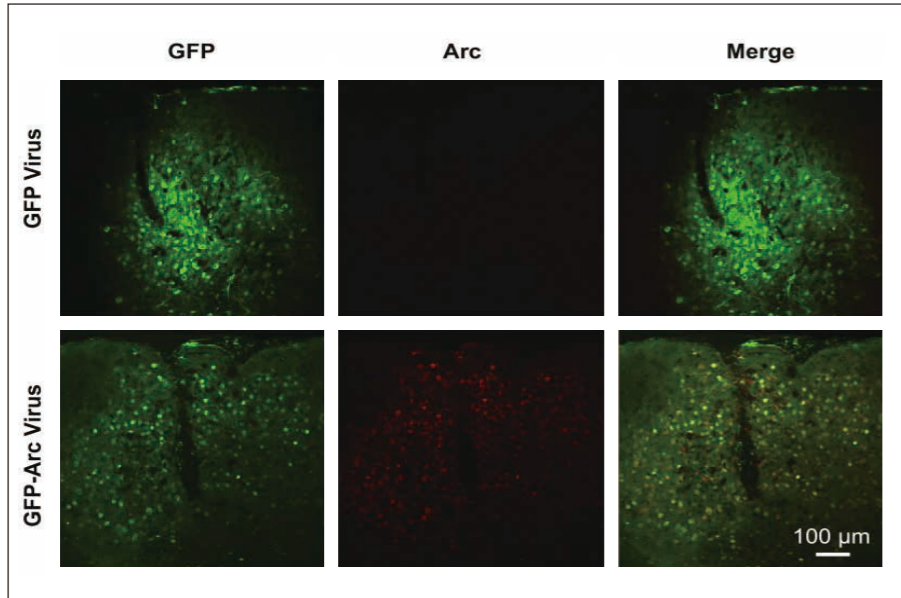


② 嘌呤霉素筛选 48 h 后，流式细胞术检测 NK92 细胞中 GFP 荧光蛋白的表达



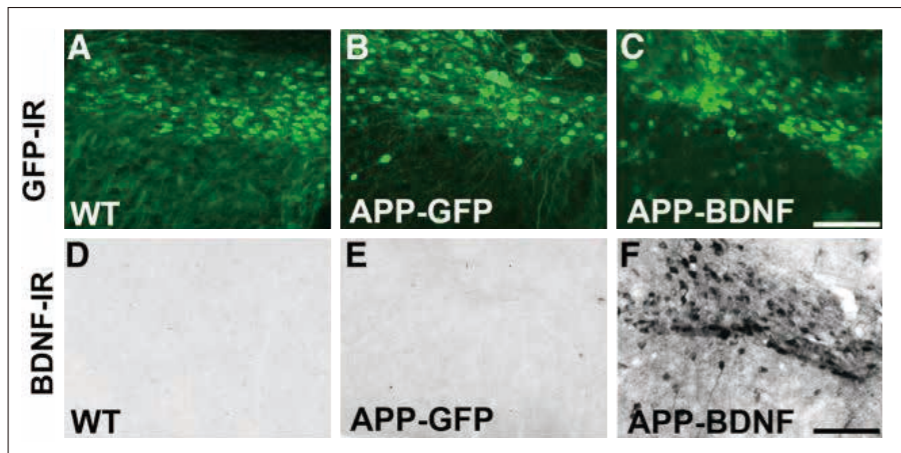
病毒滴度： 1×10^8 TU/mL

10. 慢病毒感染小鼠视觉皮层



实验动物：P180 野生小鼠 注射部位：视觉皮层 注射病毒：Lenti-GFP、Lenti-GFP-Arc
参考文献：Kyle R. Jenks et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2017

11. 慢病毒感染小鼠脑内嗅皮质



实验动物：2月龄小鼠 注射部位：脑内嗅皮质 注射量：4μL, 1.25 × 10E8IU/mL;
参考文献：Alan H. Nagahara et al. J Neurosci. 2013

Vigenebio

慢病毒

常见问题解答

1. Vigenebio 慢病毒包装细胞是什么？

通常选用 HEK293T 细胞包装慢病毒。HEK293T 细胞能提供病毒包装所需的 E1 基因。

2. Vigenebio 用的是第几代慢病毒包装系统？

Vigenebio 采用的是第三代包装系统，其 3' LTR 的增强子功能发生缺失，形成了“自灭活”，5' LTR 中的 U3 区替换成 CMV，是较安全的包装系统。

3. 什么是 MOI？

MOI (multiplicity of infection)，即感染复数，指的是感染时病毒与细胞数量的比值。一般认为 MOI 是一个比值，没有单位。

4. 慢病毒是否能够稳定表达基因？

是的。慢病毒能将外源基因整合到宿主基因组中，不会随着细胞分裂传代而丢失，因此能够实现外源基因的长期稳定表达。

5. Vigenebio 慢病毒的包装周期是多久？

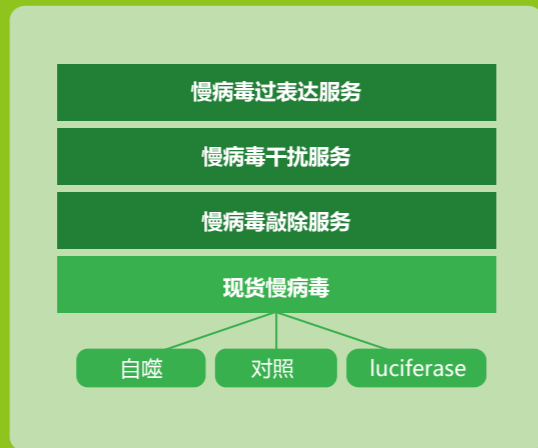
如果客户提供构建好的慢病毒载体，那么包装时间一般为 2 周左右，若包含前期载体构建等的时间，时间大概在 5 周左右。

Vigenebio

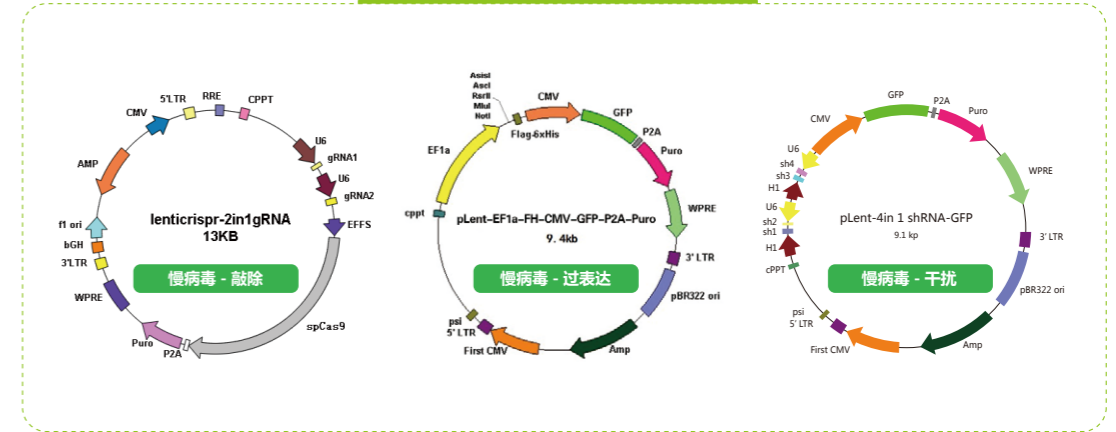
慢病毒

产品分类

Vigenebio 可为客户提供定制过表达、干扰和敲除的慢病毒，此外还提供大量现货慢病毒，如含各种荧光标签的慢病毒等。



慢病毒 - 载体



Vigene 提供的慢病毒载体

用途	慢病毒载体	用途	慢病毒载体
过表达	pLent-GFP-CMV	其他	pLent-Puro-CMV-EGFP-LC3B
	pLent-EF1a-Puro-CMV		pLent-Puro-CMV-mCherry-EGFP-LC3B
	pLent-GFP-Puro-CMV		pLent-Puro-CMV-Luciferase
	pLent-RFP- Puro-CMV		pLent-EF1a-Luciferase-CMV-copGFP-P2A-Puro
	pLent-GFP-Blasticidin-CMV		pLent-Puro-MIR-Luciferase
	pLent-RFP-Blasticidin-CMV		pLent-EF1a-circRNA-CMV-RFP-P2A-Puro
	pLent-EF1a-FH-CMV-GFP-P2A-Puro		pLent-TRE3G-hPGK-teton-puro
	pLent-EF1a-FH-CMV-RFP-P2A-Puro		pLent-TRE3G-CMV-GFP-P2A-puro
干扰	pLent-U6-GFP-Puro	pLent-TRE3G-mir30 shRNA	
	pLent-U6-RFP-Puro	pLent-U6-gRNA-CMV-GFP-P2A-Puro	
	pLent-H1-GFP-Puro	pLent-CMV-spCas9-P2A-Puro	
	pLent-H1-RFP-Puro	pLent-U6-sgRNA-CMV-RFP-P2A-BSD	
	pLent-U6-Puro	pLent-U6-sgRNA-EFFS -spCas9-P2A-puro	

Vigenebio

慢病毒

专题讨论

1、什么情况下可选用慢病毒？

慢病毒的宿主范围比较广，既能感染分裂细胞，也能感染非分裂的细胞，在体内外研究中均可选择慢病毒作为病毒载体。此外，慢病毒也是构建稳转株的理想病毒。

2. 慢病毒载体可插入多大的 ORF 片段？

一般情况下，慢病毒载体可容纳 8 kb 插入片段。然而，插入的 ORF 基因大于 4 kb 时会大大降低病毒的包装效率，进而影响病毒滴度甚至基因表达。

3. 用于慢病毒感染的细胞接种量是多少？

将状态良好的目的细胞接种到24孔板，细胞浓度一般为 1×10^5 /mL细胞，接种细胞数量需要考虑到细胞活力因素、状态因素、生长快慢因素、分裂因素等，一般是保证病毒感染时细胞汇合率达到50%-70%为佳。

4、慢病毒感染细胞后，目的基因的表达什么时间达到峰值？

慢病毒感染目的细胞后，一般情况下，在 72-96h 目的基因的表达能达到峰值，但是对于一些特殊细胞、如增殖传代比较慢的细胞，蛋白表达达到峰值则需要更长的时间。

5、怎样提高慢病毒的感染效率？

细胞良好的生长状态和感染时适合的 MOI 值是达到高感染效率的保证。一般可以通过提高感染时的 MOI 值来提高病毒的感染效率，必要时可在感染时加入助感染试剂 ADV-HR 来提高慢病毒的感染效率。

6、Vigenebio 助感染试剂 ADV-HR 的使用浓度和使用方法是什么？

助感染试剂 ADV-HR 能够显著提高慢病毒的感染效率，并呈现剂量和时间依赖效应。但较高浓度的 ADV-HR 具有细胞毒性，影响细胞状态和感染效率。我们建议您务必于目的细胞中进行 ADV-HR 浓度梯度预实验。我们在 HEK293 中的实验表明，当 ADV-HR 使用浓度小于等于 1.0×10^{-2} mg/mL 时，细胞状态良好。

此外，对于较难感染的细胞系（如 CNE2）建议使用“孵育法”，即将助感染试剂、慢病毒和一定数量的细胞悬液加至 1.5mL Eppendorf 管中，轻轻混匀，置于 37°C 培养箱中孵育 0.5 至 1 小时后转至培养皿中培养；对于较易感染的细胞系（如 HepG2）建议使用“直接加入法”，即在感染时，直接将助感染试剂、慢病毒滴加至培养皿中。建议您针对目的细胞的具体情况，选择合适的感染方法。

7、目的细胞感染慢病毒后，为什么荧光强度很低

目的细胞中蛋白的表达与病毒感染细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、GFP 前启动子的强弱、细胞类型以及观察时间等直接相关。一般代谢较旺盛的细胞（如 293T）24 小时后可以观察到荧光，代谢比较缓慢的细胞（如原代培养细胞，神经干细胞，胚胎干细胞等）蛋白表达所需时间较长，建议感染 96 小时甚至更长后观察荧光的表达。另外，感染期间，请根据细胞生长的情况及时换液，以保证细胞良好的生长状态。

8、慢病毒感染后，细胞状态很差，甚至出现死亡，为什么？

慢病毒会对细胞造成一定的毒性，不同细胞对毒性的耐受力不同。建议调整并降低感染时使用的 MOI 值，即可在细胞准备时增加铺板细胞的融合率（可提高至 70%），调整感染时加入的病毒量。此外，还可选择在感染 4 小时后换液，用新鲜的完全培养液继续培养观察。

9、慢病毒感染后为什么细胞中出现大量黑点，并影响细胞生长？

在排除细菌及真菌污染后，细胞中的黑点通常为细胞碎片。导致细胞破碎的原因有很多，但在慢病毒感染后，细胞破碎通常有两个原因：a. 慢病毒使用量过多，或细胞数量过少；b. 支原体污染。由于轻度的支原体污染并不影响细胞的生长和增殖，故支原体污染被许多实验室所忽略。但支原体易在病毒感染细胞后爆发，故会出现大量细胞碎片。我们建议在使用病毒制品时，应首先排除细胞、培养物及培养环境中的支原体污染，以节约您的宝贵时间。

10、慢病毒感染各类细胞的 MOI 参考值：

细胞名称	物种	细胞中文名	MOI参考值
A375	人	人黑色素瘤	10
A498	人	人肾癌细胞	100
A549	人	人肺腺癌	20
A673	人	人横纹肌瘤细胞	10
ACC-2	人	人唾液腺腺样囊性癌肺低转移细胞株	20
ACC-M	人	人涎腺腺样囊性癌肺高转移细胞株	20
ACHN	人	人肾癌细胞株	10
AGS	人	人胃癌细胞	100
AsPC-1	人	人胰腺癌细胞系	10
BEL-7402	人	人肝癌细胞	10
BGC-823	人	人胃癌细胞	100
BxPc-3	人	人胰腺癌细胞	20
C666-1	人	人鼻咽癌细胞	10
CFPAC-1	人	人胰腺癌细胞	50
CNE	人	人鼻咽癌细胞	10
CNE1-Y	人	人鼻咽癌细胞	100
COCl	人	人卵巢癌细胞	>100
COCl/DDP	人	人卵巢癌细胞	>100
CWR22RV1	人	人前列腺癌细胞	20
DLD-1	人	人结肠肿瘤细胞株	10
DU 145	人	雄激素非依赖型前列腺癌细胞	20
EC9706	人	人食管癌细胞	10
ECA109	人	人食管癌细胞系	20
FL-18	人	人滤泡性淋巴瘤	20
GBC-SD	人	人胆囊癌细胞株	30
H-125	人	人肺癌细胞	>100
H1299	人	人非小细胞性肺癌细胞	1
H929	人	人多发性骨髓瘤癌症细胞系	100
HaCaT	人	人永生表皮细胞	>100
h-BMSC	人	骨髓间充质干细胞	10
HCC-1937	人	人乳腺癌细胞株	50
HCCLM3	人	人肝细胞肝癌细胞系	20
HCCLM6	人	人肝细胞肝癌细胞系	20
HCT116	人	人结肠癌细胞	10
HEC-1A	人	人子宫内膜癌细胞株	1
HEC-1-B	人	人子宫内膜癌细胞株	2
HeLa	人	人宫颈癌细胞株	10
Hep 3B	人	人肝癌细胞株	10
Hep G2	人	人肝癌细胞	10
Hep-2	人	人喉癌细胞株	10
hFOB 1.19	人	人胎儿成骨样细胞株	20
HL-60	人	人急性髓系白血病细胞株	>100
HLE-B3	人	人晶状体上皮细胞系	1
h-MSC	人	骨髓间充质干细胞	10
HOS	人	人骨肉瘤细胞系	20
HT-29	人	人结肠癌细胞	10
Huh-7	人	人肝癌细胞系	10
HUVEC-2C	人	人脐静脉血管内皮细胞	10
HUV-EC-C	人	人脐静脉内皮细胞系	20
ishikawa	人	人子宫内膜癌细胞	50
JEG-3	人	人绒癌细胞系	100
Jurkat	人	人白血病细胞株	50
K562	人	人白血病细胞	20
kasumi	人	人白血病细胞株	10

细胞名称	物种	细胞中文名	MOI参考值
KB	人	人口腔上皮癌	10
KM3	人	多发性骨髓瘤细胞	100
LOV0	人	人结肠腺癌细胞株	10
LNCAP	人	人前列腺癌细胞	5
LTEP-A-2	人	人肺腺癌细胞	100
MCF-7	人	人乳腺癌细胞株	20
MCF-7/A	人	人乳腺癌细胞株	10
MDA-MB-231	人	人乳腺癌细胞	10
MDA-MB-468	人	人乳腺癌细胞株	10
MG-63	人	人成骨肉瘤细胞株	50
MGC-803	人	人胃癌细胞	50
MHCC-97-H	人	高转移性肝癌细胞株	5
MHCC-97-L	人	低转移性肝癌细胞株	5
MKN-28	人	人胃癌细胞株	20
MKN-45	人	人胃低分化腺癌细胞株	20
Molt-4	人	人T淋巴细胞白血病细胞株	>100
MRC-5	人	人胚胎成纤维细胞	10
NB4	人	人白血病细胞株	50
NK-92-mi	人	人天然杀伤性细胞系	>100
panc-1	人	人胰腺癌细胞	2
PC-3	人	人前列腺癌细胞	20
RKO	人	人结肠癌细胞	2
RPE	人	人视网膜色素上皮细胞	10
Saos-2	人	人骨肉瘤细胞	10
ScaBER	人	人膀胱癌细胞	200
SEG-1	人	人食管腺癌	100
SGC-7901	人	人胃癌细胞	10
SHG-44	人	人脑胶质瘤细胞	10
SK-BR-3	人	乳腺癌腹腔转移癌细胞株	50
SK-OV-3	人	卵巢癌细胞株	2
SK-OV-3/DDP	人	卵巢癌细胞株	10
SMMC-7721	人	人肝癌细胞	10
SPC-A-1	人	人肺腺癌细胞	100
SRA01/04	人	人晶状体细胞	30
SW1990	人	人胰腺癌	50
SW480	人	人结肠癌细胞株	10
SW620	人	人结肠癌细胞	100
T24	人	人膀胱癌	5
T-47D	人	人乳腺癌细胞	50
Tca8113	人	人舌鳞状细胞癌	10
THP-1	人	人单核细胞株	50
U251	人	人脑胶质母细胞瘤	1

维真生物
Vigene Biosciences

载体全 滴度高

- 过表达
- 干扰
- 敲除

细胞名称	物种	细胞中文名	MOI参考值
U-2OS	人	人骨肉瘤细胞	3
U87	人	人脑星形胶质母细胞瘤	1
U937	人	人单核细胞	20
ZR-75-30	人	人乳腺癌细胞株	20
CHO	仓鼠	中国仓鼠卵巢细胞	20
CHO/TSH	仓鼠	中国仓鼠卵巢细胞	100
BRL	大鼠	大鼠肝细胞	20
BRL-3A	大鼠	大鼠肝细胞	100
C6	大鼠	大鼠脑胶质瘤	>100
GH3	大鼠	垂体腺瘤细胞	100
H9C2	大鼠	大鼠胚胎心肌细胞	20
HSC-T6	大鼠	大鼠肝星形细胞	10
IEC6	大鼠	大鼠肠上皮细胞株	10
MMQ	大鼠	大鼠垂体瘤细胞(原代)	20
NR8383	大鼠	大鼠肺泡巨噬细胞	1
NRK	大鼠	大鼠肾细胞	10
SHZ-88	大鼠	大鼠乳腺癌细胞	20
MV-1-LU	貂	貂肺泡上皮细胞株	10
RF/6A	恒河猴	恒河猴视网膜-脉络膜血管内皮细胞系	100
VERO-E6	猴	非洲绿猴肾细胞	5
4T1	小鼠	小鼠乳腺癌细胞	>100
B16	小鼠	小鼠黑色素瘤细胞	>100
Hepa 1-6	小鼠	小鼠肝癌细胞	100
JB6	小鼠	小鼠表皮细胞	>100
Lewis	小鼠	小鼠肺癌细胞	20
MDPC-23	小鼠	小鼠成牙本质细胞样细胞	>100
MFC	小鼠	小鼠乳腺癌	80
MIN-6	小鼠	小鼠胰岛素细胞	100
NIH-3T3	小鼠	小鼠成纤维细胞系	20
Raw264.7	小鼠	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10 (感染后分化)
BTT	小鼠	小鼠膀胱癌细胞	20
5637	人	人膀胱癌细胞株	10
7402	人	人肝癌细胞	10
293T	人	人胚肾上皮细胞	1
5-8F	人	人鼻咽癌细胞株	100
95D	人	人肺巨细胞癌	2

原代细胞	物种	MOI参考值
大鼠肌腱细胞	大鼠	40
大鼠软骨细胞	大鼠	20
大鼠骨髓间充质干细胞	大鼠	3
大鼠神经元细胞	大鼠	1
大鼠神经胶质细胞	大鼠	20
大鼠雪旺氏细胞	大鼠	20
大鼠小胶质细胞	大鼠	100
大鼠乳鼠心肌细胞	大鼠	20
大鼠肝星状细胞	大鼠	100
大鼠胰岛细胞	大鼠	>100
小鼠骨髓间充质干细胞	小鼠	10
小鼠肝脏细胞	小鼠	>100
人骨髓间充质干细胞	人	100
人胎盘间充质干细胞	人	50
人SK神经瘤母细胞	人	20
人皮肤成纤维细胞	人	20
人脐动脉血管平滑肌细胞	人	100
人脐静脉血管内皮细胞	人	10
人冠动脉血管平滑肌细胞	人	10

Vigenebio

慢病毒

运输 & 储存

为保证病毒活性，Vigenebio 病毒产品均通过干冰快递运输，请于收到产品后，第一时间在 BL2 生物安全柜中根据实验所需量将病毒进行分装。分装时请将病毒始终放置在冰上，分装的病毒可在 4℃保存 3 天，其余病毒请于液氮或 -80℃冰箱冻存。请避免反复冻融，否则会影响病毒滴度。在未反复冻融情况下，-80℃可以有效保存 6 个月，超出该储存时间则需重新进行质控鉴定。



Vigenebio

慢病毒

部分客户代表性文章

1. Adv Sci. (IF=12.441). Bi-Qin Lai, et.al. (2018). A Modular Assembly of Spinal Cord-Like Tissue Allows Targeted Tissue Repair in the Transected Spinal Cord.[过表达 脊髓损伤]



2. Nucleic Acids Research. (IF=9.202). Lima WF, et.al. (2016). RNA cleavage products generated by antisense oligonucleotides and siRNAs are processed by the RNA surveillance machinery. [干扰]
3. Theranostics.(IF=8.063).Dongmei Mai.et al.(2018).PIWI-interacting RNA-54265 is oncogenic and a potential therapeutic target in colorectal adenocarcinoma.[过表达 结直肠癌]
4. Oncogene. (IF=6.854). Liao Y, et.al. (2018). Growth arrest and apoptosis induction in androgen receptor-positive human breast cancer cells by inhibition of USP14-mediated androgen receptor deubiquitination.[4in1 shRNA慢病毒 乳腺癌]
5. Cell Death Dis.(IF=5.378).KeShan Wang,et al.(2019).LXRα promotes cell metastasis by regulating the NLRP3 inflammasome in renal cell carcinoma. [过表达 肾细胞癌]
6. Cell Death Dis. (IF=5.378). Sun S, et.al. (2017). Loss of the novel mitochondrial protein FAM210B promotes metastasis via PDK4-dependent metabolic reprogramming. [过表达 肿瘤]
7. Sci Rep. (IF=5.228). Liu J, et al. (2016). Mechanical stretching stimulates collagen synthesis via downregulating SO2/AAT1 pathway. [过表达 肺动脉成纤维细胞PAFs]
8. J Am Heart Assoc. (IF=5.117). Yu W , et al. (2016). Sulfur Dioxide Protects Against Collagen Accumulation in Pulmonary Artery in Association With Downregulation of the Transforming Growth Factor b1/Smad Pathway in Pulmonary Hypertensive Rats. [过表达 肺动脉成纤维细胞 PAFs]
9. Oncotarget.(IF=5.008). Sun Y, et al. (2017). sulfhydration-associated phosphodiesterase 5a dimerization mediated vasorelaxant effect of hydrogen sulfide. [过表达 大鼠主动脉平滑肌细胞 ASMCs]
10. Oncotarget.(IF=5.008). Shi L, et al. (2017). miR-127 promotes EMT and stem-like traits in lung cancer through a feed-forward regulatory loop. [过表达 肺癌PC9]
11. J Cell Mol Med.(IF=4.499). Lou G, et al. (2017). MiR-122 modification enhances the therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against liver fibrosis. [过表达 肝纤维化AMSCs]
12. Tumor Biol. (IF=2.926). Li Y, et al. (2017). The role of Sox6 and Netrin-1 in ovarian cancer cell growth, invasiveness, and angiogenesis. [过表达 卵巢癌细胞]
13. Oncol Rep. (IF=2.662). Kong Q, et.al. (2017). MicroRNA-194 suppresses prostate cancer migration and invasion by downregulating human nuclear distribution protein. [过表达和干扰 前列腺癌]
14. MOL MED REP. (IF=1.559). Zhao W, et al. (2017). Lentivirus-mediated overexpression of CD97/ADGRE5 reverses dysregulated high glucose-induced endothelial cell migration. [过表达 HUVEC]

.....

安全操作规范 与免责声明

1. 使用腺病毒载体前请向您所在机构的生物安全部门征得许可和指令。
2. 请在 BL2 生物安全二级生物安全柜中操作病毒。
3. 操作病毒和转染细胞时，请务必穿着实验服，佩戴口罩和手套。
4. 请小心操作，避免产生气雾或飞溅。被病毒污染的超净工作台，请立即用 70% 乙醇加 1% SDS 溶液擦拭干净。接触病毒的枪头、离心管、培养板、培养液请使用新鲜配制的 1% 次氯酸钠溶液进行消毒操作后丢弃。
5. 用显微镜观察细胞感染情况时，请先拧紧培养瓶或盖紧培养板，用 70% 乙醇擦拭培养瓶外壁后，显微镜下观察拍照。观察完毕，请用 70% 乙醇再次擦拭显微镜实验台。
6. 离心病毒时，应使用密封性好的离心管，或用封口膜封口后进行离心，请尽量使用组织培养室内的离心机。
7. 实验完毕脱掉手套后，请立即用肥皂和水清洗双手。
9. Vigene 保证您收到的产品符合产品目录上的规格。
10. Vigene 不提供其他任何形式的对于产品商业或健康用途的保证。
11. Vigene 不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。

| 载体构建 | 腺病毒 | 慢病毒 | 腺相关病毒 |

Vigenebio 维真产品与服务



| 载体构建 | 腺病毒 | 慢病毒 | 腺相关病毒 |