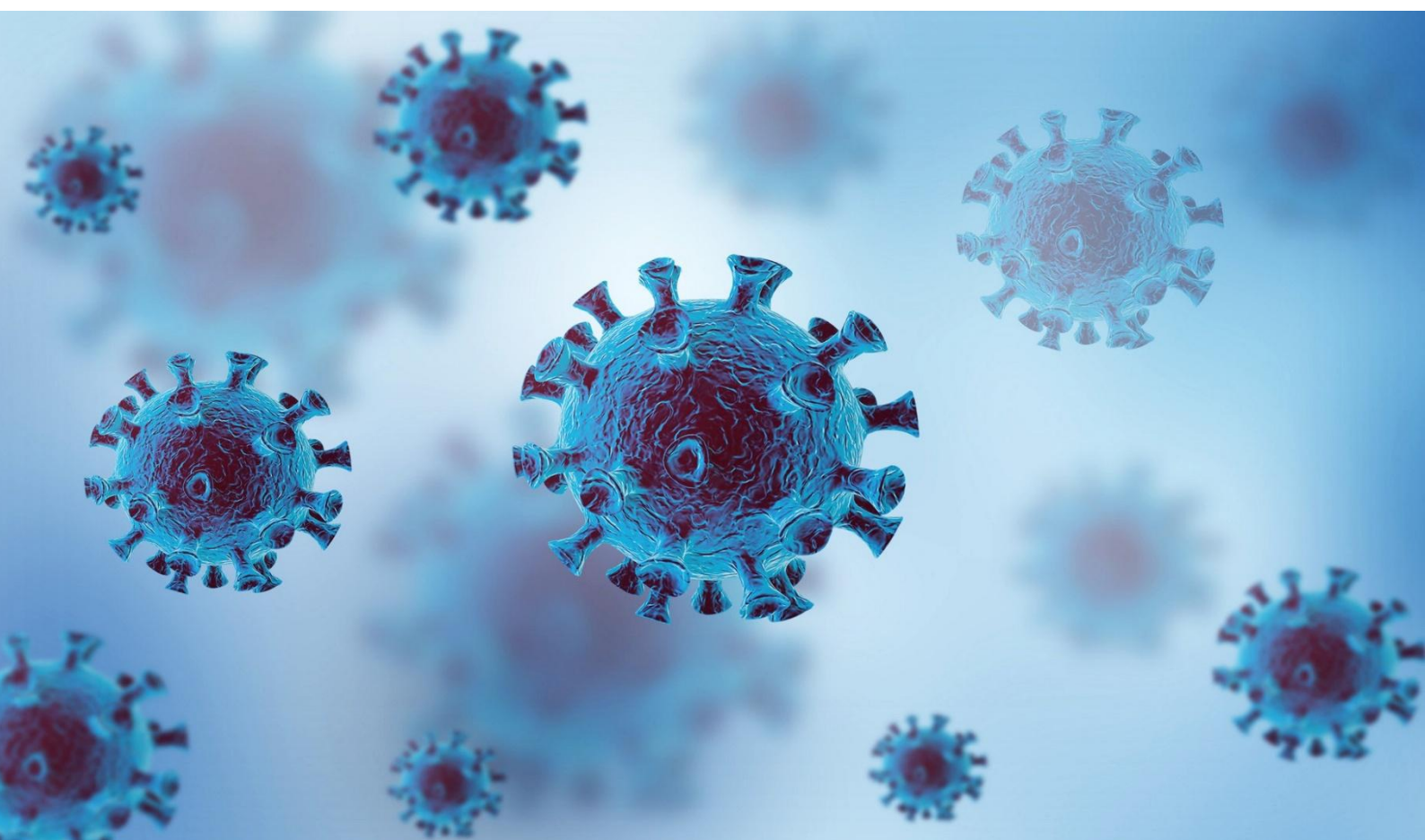


慢病毒 (LV) 表达系统 产品说明书



·分子克隆 ·腺病毒 ·腺相关病毒 ·慢病毒 ·细胞系建立 ·筛选检测

一、声明与责任担保

1. **使用限制声明：**赛恩宝生物科技有限公司产品仅限科研用途，严禁用于人类或体外诊断、治疗等其他用途。未经书面批准，产品不得修改、转售、转赠第三方，也不可用于向第三方提供服务或制造商品化产品。
2. **有限责任担保：**赛恩宝生物保证产品符合目录规格，承担更换产品责任。但不提供产品商业或健康用途的其他保证，对因使用或不当使用产品造成的各类损害后果不承担责任。

二、产品储存

收到产品后，立即在 BL2 生物安全柜中按需分装病毒，分装时全程将病毒置于冰上。分装后的病毒 4℃可保存 3 天，其余病毒需-80℃冻存，务必避免反复冻融，以免降低病毒滴度。

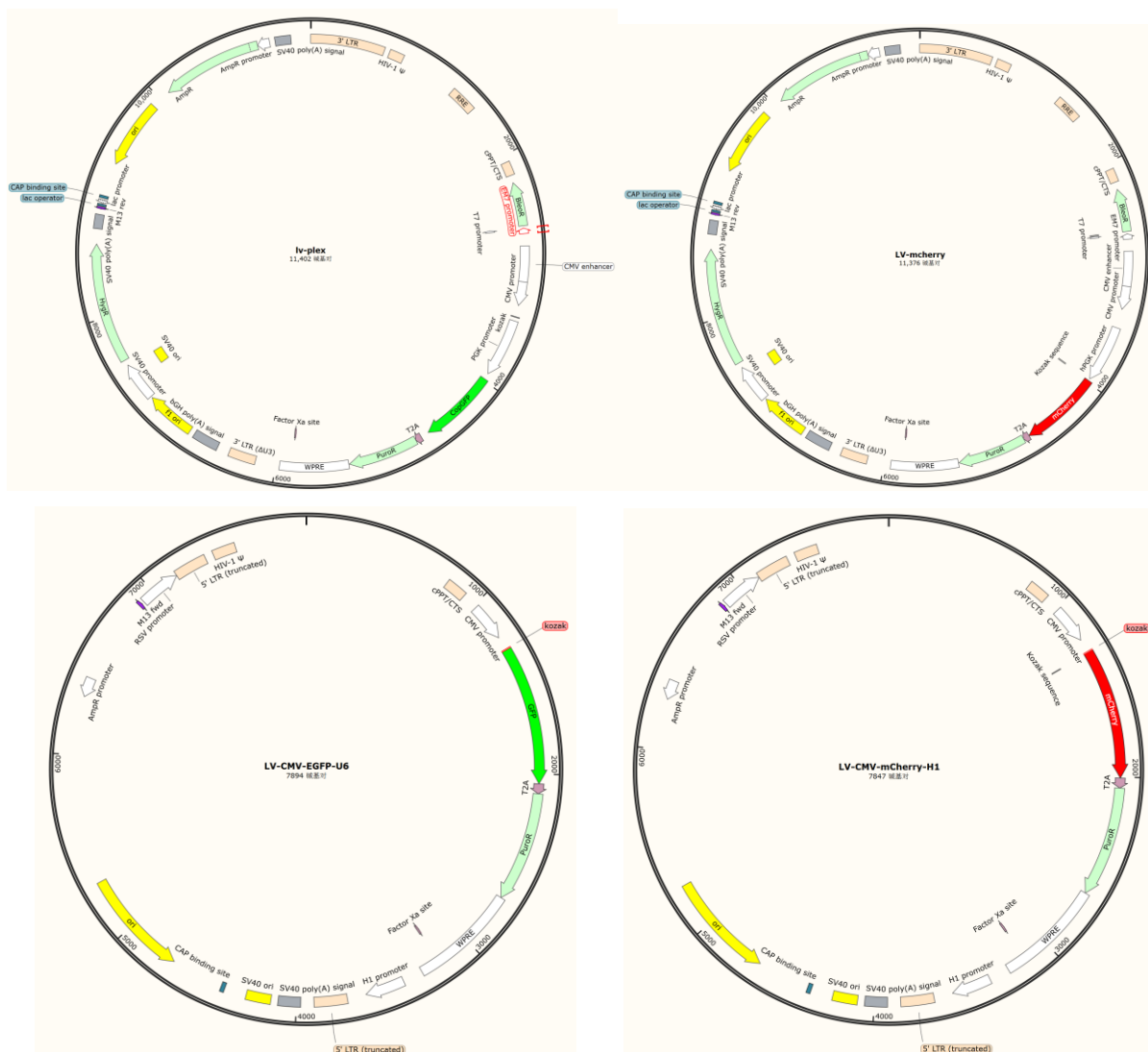
三、产品介绍

慢病毒属于逆转录病毒科，其基因组为单链 RNA。在感染细胞过程中，慢病毒表面的包膜蛋白会与细胞表面的特异性受体结合，随后病毒与细胞膜发生融合，将病毒核心颗粒释放到细胞内。在细胞内，病毒基因组 RNA 在逆转录酶的作用下，逆转录为双链 DNA。接着，在整合酶的协助下，双链 DNA 整合到宿主细胞的基因组中，实现外源基因的稳定表达。与其他基因传递工具相比，慢病毒具有显著优势。它能够感染包括分裂细胞和非分裂细胞在内的多种细胞类型，宿主范围极为广泛；并且外源基因整合到宿主基因组后，可长期稳定表达，能满足长期研究需求；此外，其免疫原性较低，在体内应用时引发的免疫反应相对较弱，安全性较高。

赛恩宝生物慢病毒系统产品是一款适用于多场景的专业基因传递工具，广泛应用于科研和生物学等领域。其基于成熟的慢病毒载体技术研发而成，能够高效地将外源基因导入各类细胞，为基因功能研究、疾病机制探索以及细胞治疗等研究提供了有力支持。通过严谨的生产工艺和严格的质量把控，该产品具备高滴度、高稳定性等优势，可确保实验结果的可靠性和重复性。

赛恩宝生物慢病毒载体类型丰富，具备多种标签和荧光标记，多数载体拥有与 pEnter 穿梭载体相同的 MCS 多克隆位点及筛选标记，Myc、Flag 等融合标签便于改造添加。相比质粒载体，其体外转染稳定性更佳，具体载体如下：

用途	慢病毒载体
过表达	pLex-GFP-Puro-CMV、pLex-RFP-Puro-CMV 等多种载体，部分含特殊启动子与标签组合
干扰	pLenti-U6-GFP-Puro、pLenti-U6-RFP-Puro 等系列载体
其他	pLenti-MIR-GFP-Puro、pLenti-EF1a-Puro-CMV-Luciferase 等特色载体



五、产品组成及特点

（一）慢病毒载体

赛恩宝生物提供丰富多样的慢病毒载体，涵盖过表达载体、RNA 干扰载体、基因编辑载体等多种类型，充分满足不同实验目的需求。这些载体经过精心设计和优化，包含高效的启动子、合适的筛选标记以及必要的调控元件。例如，常用的 CMV 启动子可在多种细胞中高效启动基因转录；载体上的荧光标记基因（如 GFP、RFP）和抗生素抗性基因（如 Puromycin 抗性基因），便于对转染细胞进行筛选和鉴定。在生产过程中，严格遵循标准化流程，确保每一批次的慢病毒载体都具有高滴度和稳定的质量，为实验的顺利开展提供可靠保障。

（二）包装系统

采用先进的多质粒包装系统，通常由包装质粒、包膜质粒和载体质粒组成。包装质粒编码病毒的核心结构蛋白和酶类，包膜质粒提供病毒的包膜蛋白，决定病毒的感染特性和宿主范围，而载体质粒则携带外源目的基因。各质粒之间相互协作，实现高效的病毒包装过程。通过优化转染条件和质粒比例，在 293T 等常用包装细胞系中，能够产生大量具有高感染活性的慢病毒颗粒。该包装系统不仅能够保证病毒的高效包装，还能有效提高病毒载体的安全性，降低潜在风险。

（三）配套试剂与服务

为了更好地服务于用户的实验需求，赛恩宝生物还提供一系列配套试剂，包括病毒浓缩试剂、纯化试剂以及滴度测定试剂盒等。病毒浓缩和纯化试剂能够有效去除杂质，提高病毒滴度，增强病毒的感染能力；精准的滴度测定试剂盒可帮助用户准确测定病毒滴度，确保实验中病毒使用量的准确性。此外，公司拥有专业的技术支持团队，能够为用户提供全方位的技术服务，从实验设计、载体构建到病毒包装和应用，全程为用户提供专业的指导和建议。同时，还可根据用户的特殊需求，提供定制化的慢病毒产品和解决方案，满足多样化的研究需求。

六、产品应用领域

（一）基础科研

在基因功能研究方面，慢病毒系统可将目的基因导入细胞，通过过表达或沉默特定基因，深入探究基因在细胞生长、分化、凋亡等生理过程中的作用机制。在信号通路研究中，利用慢

病毒介导的基因操作，能够研究信号通路中关键基因的调控作用，揭示复杂的细胞信号网络。此外，在疾病模型构建领域，慢病毒可以将致病基因导入动物或细胞，模拟疾病发生发展过程，为疾病机制研究和药物研发提供重要的模型基础。

（二）药物研发

在药物靶点筛选过程中，慢病毒系统可用于建立稳定表达或干扰特定基因的细胞模型，通过高通量筛选技术，快速筛选出具有潜在治疗作用的药物靶点。在药物疗效评估方面，将药物作用于慢病毒构建的疾病模型细胞或动物，观察药物对疾病相关基因和表型的影响，为药物研发提供可靠的实验数据支持。同时，慢病毒在基因治疗药物研发中也发挥着重要作用，可作为载体将治疗性基因导入患者细胞，为基因治疗的临床应用提供技术支持。

（三）细胞治疗

在 CAR-T 细胞治疗中，慢病毒能够将嵌合抗原受体（CAR）基因导入 T 细胞，使 T 细胞能够特异性识别和杀伤肿瘤细胞，为肿瘤治疗提供了新的有效手段。在干细胞治疗领域，慢病毒可用于修饰干细胞，赋予干细胞特定的功能或特性，促进干细胞的定向分化和组织修复，为治疗多种难治性疾病带来了新的希望。

七、操作流程指南

（一）赛恩宝生物慢病毒生产流程

- 细胞准备：**选择生长状态良好的 293T 细胞作为包装细胞，在转染前一天，将细胞接种于合适的培养器皿中，调整细胞密度，使其在转染时达到 70%-80% 的融合度。培养过程中，使用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基，在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养，确保细胞处于对数生长期，为后续的转染和病毒包装提供良好的细胞基础。
- 质粒转染：**按照特定比例将包装质粒、包膜质粒和载体质粒混合，使用高效的转染试剂（如脂质体转染试剂）进行转染操作。具体转染步骤严格按照转染试剂说明书进行，将混合质粒与转染试剂充分混合后，加入到培养细胞的培养基中，轻轻混匀，使质粒能够有效转染进入细胞。转染后，将细胞继续置于培养箱中培养，期间避免频繁移动细胞，确保转染效率。

3. **病毒收集：**在转染后 48-72 小时，收集含有慢病毒颗粒的细胞上清液。为提高病毒产量，可在收集前更换一次新鲜培养基。收集上清液时，小心操作，避免细胞脱落进入上清液中。将收集到的上清液转移至离心管中，进行初步离心（如 1000rpm，离心 5 分钟），去除细胞碎片，得到较为纯净的病毒上清液。
4. **病毒浓缩与纯化：**赛恩宝生物采用超速离心的方法纯化慢病毒，去除上清液中的杂质和多余的培养基成分，浓缩病毒颗粒。如果您自己包装慢病毒，可使用公司提供的病毒浓缩纯化试剂盒，按照说明书进行操作，以获得高滴度、高纯度的慢病毒。

（二）慢病毒储存与运输

1. **储存：**收到慢病毒产品后，若在短期内（3-5 天）使用，可将病毒置于 4℃冰箱保存；如需长期保存，应将病毒分装成小份，置于-80℃冰箱冻存。需要注意的是，反复冻融会显著降低病毒滴度，每次冻融约使病毒滴度下降 10%-20%，因此应尽量减少冻融次数，按照实验使用量进行合理分装。
2. **运输：**赛恩宝生物采用干冰冷藏运输的方式确保慢病毒在运输过程中的稳定性。用户收到病毒后，应立即将其转移至相应的储存条件下（-80℃），避免长时间暴露在常温环境中，防止病毒活性受到影响。

（三）慢病毒感染细胞

1. **预实验确定 MOI 值：**由于不同细胞对慢病毒的敏感性存在差异，在正式实验前，需通过预实验确定合适的感染复数（MOI）。一般设置多个 MOI 梯度（如 1、5、10、20、50 等），用不同 MOI 的慢病毒感染目的细胞，同时设置阳性对照细胞（如 293T 细胞）和阴性对照（未感染病毒的细胞）。在感染后 48-72 小时，通过观察细胞荧光表达（若载体带有荧光标记）或检测目的基因表达水平，确定最佳 MOI 值，以保证在获得较高感染效率的同时，避免对细胞造成过度毒性。
2. **细胞接种：**在感染前一天，将目的细胞接种到合适的培养器皿中，根据细胞的生长特性和实验需求，调整细胞密度，使细胞在感染时处于对数生长期且融合度达到 50%-70%。例如，在 24 孔板中进行感染实验时，每孔可接种 $3-5 \times 10^4$ 个细胞，确保细胞有足够的生长空间和良好的生长状态，有利于病毒感染。

3. **病毒稀释与感染：**根据预实验确定的 MOI 值，计算所需的病毒量。从冰箱中取出慢病毒，置于冰浴中融化，用无血清培养基或 PBS 将病毒稀释至所需浓度。吸去细胞原有的培养基，加入稀释好的病毒液，轻轻摇晃培养器皿，使病毒液均匀覆盖细胞，然后将细胞置于培养箱中继续培养。对于一些难以感染的细胞类型，可在培养基中添加适量的 Polybrene（聚凝胺），通常浓度为 6-8 μ g/ml，以提高病毒的感染效率，但需注意 Polybrene 对部分细胞可能存在一定的毒性，使用前应进行毒性测试。
4. **换液与培养：**感染 16-24 小时后，吸除含有病毒的培养基，更换为新鲜的完全培养基，继续在培养箱中培养细胞。在后续培养过程中，密切观察细胞的生长状态和感染情况，根据细胞的生长需求适时更换培养基，保持细胞良好的生长环境。
5. **感染效率检测：**在感染后 48-72 小时，可通过多种方法检测感染效率。若载体带有荧光标记（如 GFP、RFP），可使用荧光显微镜直接观察细胞的荧光表达情况，通过计算荧光细胞的比例来估算感染效率；也可采用 qPCR、WesternBlot 等分子生物学方法，检测目的基因的 mRNA 或蛋白表达水平，从而准确评估慢病毒对细胞的感染效果。

（四）稳转细胞株筛选（如需）

1. **抗生素筛选：**若慢病毒载体携带抗生素抗性基因（如 Puromycin 抗性基因），在感染细胞 48-72 小时后，将细胞转移至含有相应抗生素的培养基中进行筛选。筛选前，需通过预实验确定合适的抗生素筛选浓度，以确保既能有效杀死未感染的细胞，又不会对感染细胞造成过度毒性。在筛选过程中，每 2-3 天更换一次含有抗生素的培养基，持续筛选直至未感染病毒的对照组细胞全部死亡，此时存活下来的细胞即为成功转染并整合了慢病毒载体的细胞。
2. **单克隆筛选（可选）：**为获得单一细胞来源的稳定转染细胞株，可对筛选得到的抗性细胞进行单克隆筛选。常用的方法包括有限稀释法和流式细胞分选法。有限稀释法是将细胞进行梯度稀释，使每个孔中仅有单个细胞，然后在含有抗生素的培养基中培养，待细胞形成单克隆后，挑选阳性克隆进行扩大培养；流式细胞分选法则利用细胞表面标记或荧光信号，通过流式细胞仪将单个细胞分选到 96 孔板中进行培养。筛选出的单克隆细胞株需进一步通过 qPCR、WesternBlot 等方法鉴定目的基因的表达水平，确保其稳定性和表达效果。

八、注意事项

1. **生物安全：** 尽管慢病毒载体经过改造，安全性较高，但在操作过程中仍需严格遵守生物安全规范。所有操作应在生物安全柜中进行，操作人员需佩戴实验服、手套、口罩等防护用品，避免病毒接触皮肤和黏膜。操作完成后，对实验台面和仪器设备进行彻底消毒，使用过的耗材和废弃物应按照生物危害废弃物进行专门处理，防止病毒泄漏和传播。
2. **病毒稳定性：** 慢病毒对温度、pH 值等环境因素较为敏感。在储存和使用过程中，应避免病毒暴露在高温或极端 pH 值环境中。从冰箱取出病毒后，应尽快置于冰浴中，避免长时间在常温下放置。同时，严格控制病毒的冻融次数，尽量减少不必要的冻融，以维持病毒的活性和滴度。
3. **细胞状态：** 细胞的生长状态对慢病毒感染效率至关重要。在进行感染实验前，确保细胞处于对数生长期，形态正常，无污染。避免使用传代次数过多、老化或状态不佳的细胞，定期对细胞进行复苏和传代，保持细胞的良好活力。在细胞培养过程中，严格控制培养条件，包括温度、CO₂浓度、培养基成分等，为细胞提供适宜的生长环境。
4. **实验对照设置：** 为准确评估实验结果，排除干扰因素，在实验中应设置充分的对照。阳性对照可选择对慢病毒敏感且已知感染效果良好的细胞系，用于验证病毒的感染活性；阴性对照为未感染病毒的细胞，用于检测背景信号和细胞自身的状态；空白对照则只添加培养基，不加入细胞和病毒，用于检测实验环境和试剂的纯度。通过对比不同对照和实验组的结果，能够更准确地分析慢病毒感染对细胞的影响。
5. **质量控制：** 使用赛恩宝生物慢病毒系统产品前，仔细检查产品包装是否完整，有无漏液、浑浊等异常现象。如发现产品质量问题，应立即联系公司技术支持人员。在实验过程中，定期对病毒滴度进行检测，尤其是在病毒储存一段时间后或进行重要实验前，确保病毒滴度符合实验要求，保证实验结果的可靠性和重复性。

九、常见问题解答

1. **为什么慢病毒感染效率低？**

可能原因： 细胞状态不佳、MOI 值不合适、病毒滴度不准确、感染时间不足、培养条件不适宜、细胞表面受体表达量低等。

解决方法：优化细胞培养条件，确保细胞处于最佳生长状态；重新进行预实验，准确确定合适的 MOI 值；使用准确的滴度测定方法重新测定病毒滴度；适当延长感染时间；检查培养箱温度、CO₂浓度等培养条件是否正常；若细胞表面受体表达量低，可尝试对细胞进行预处理或选择其他感染方法。

2. 慢病毒感染后细胞出现毒性反应怎么办？

可能原因：MOI 值过高、病毒本身对细胞有毒性、感染时间过长、细胞对 Polybrene 敏感（若使用了 Polybrene）等。

解决方法：降低 MOI 值，重新进行感染实验；缩短感染时间，在感染早期更换新鲜培养基；若病毒本身对细胞有毒性，可尝试选择其他病毒载体或优化载体设计；对于对 Polybrene 敏感的细胞，减少 Polybrene 的使用浓度或不使用 Polybrene，改用其他提高感染效率的方法。

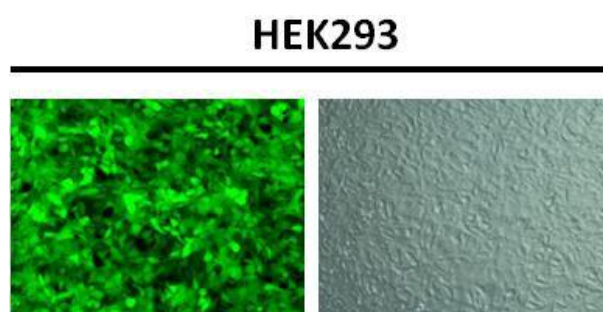
3. 如何提高稳转细胞株的筛选效率？

解决方法：准确确定抗生素筛选浓度，可通过预实验设置多个浓度梯度进行筛选；在筛选过程中及时更换含有抗生素的培养基，保持筛选压力稳定；采用合适的单克隆筛选方法，如有限稀释法时确保细胞稀释均匀，流式细胞分选法时准确设置分选参数；对筛选得到的细胞进行定期鉴定和传代，确保细胞株的稳定性和目的基因的表达。

4. 病毒储存超过 6 个月后还能使用吗？

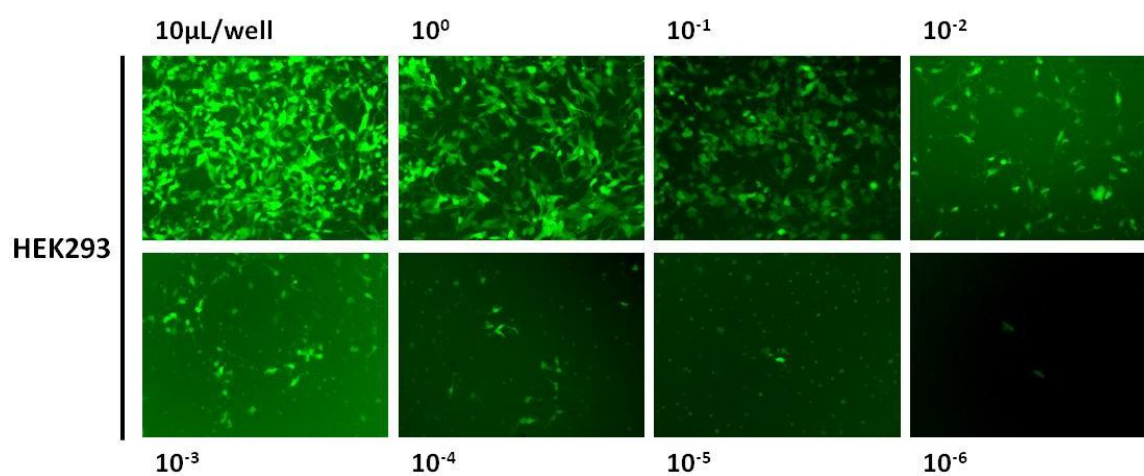
解答：慢病毒在-80℃储存条件下可存放 6 个月以上，但储存时间超过 6 个月后，病毒滴度可能会有所下降。在使用前，建议重新测定病毒滴度，根据测定结果调整病毒使用量。若病毒滴度下降过多，可能需要重新制备病毒或增加病毒使用量，以保证实验效果。

附录 1.赛恩宝生物慢病毒感染 HEK293 细胞案例



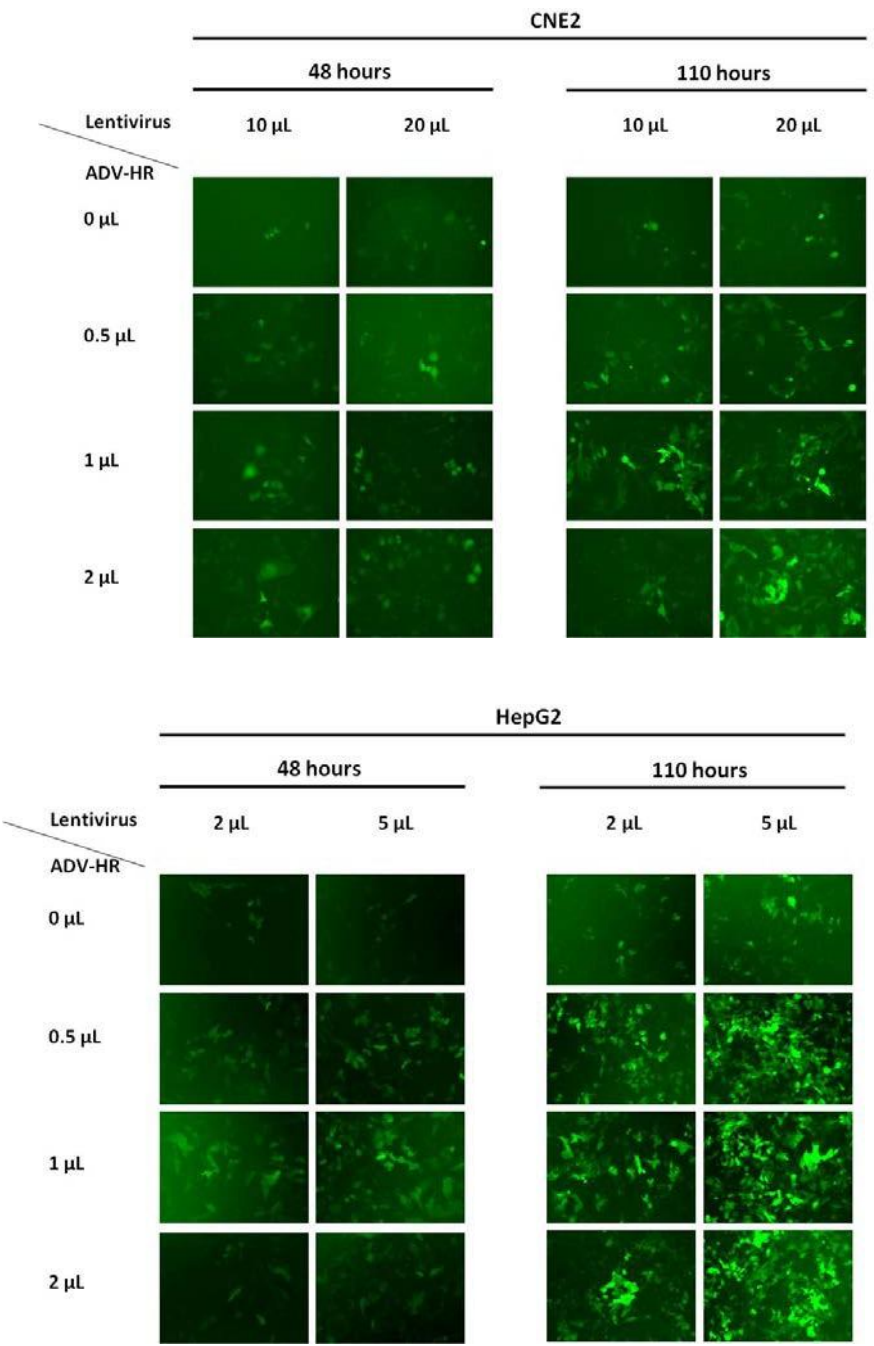
10^9 TU/mL, MOI $\approx$ 10, 感染后48小时拍照

附录 2.赛恩宝生物慢病毒滴度测定案例



3.046×10⁹VP/mL, 3.20×10⁸TU/mL, 感染后72小时拍照

附录 3.助感染试剂在慢病毒感染中的作用



10⁹VP/mL, 感染后48及110小时拍照