

慢病毒包装手册

慢病毒包装手册（一）：前世今生——包装原理

慢病毒包装手册（二）：实操——包装 protocol

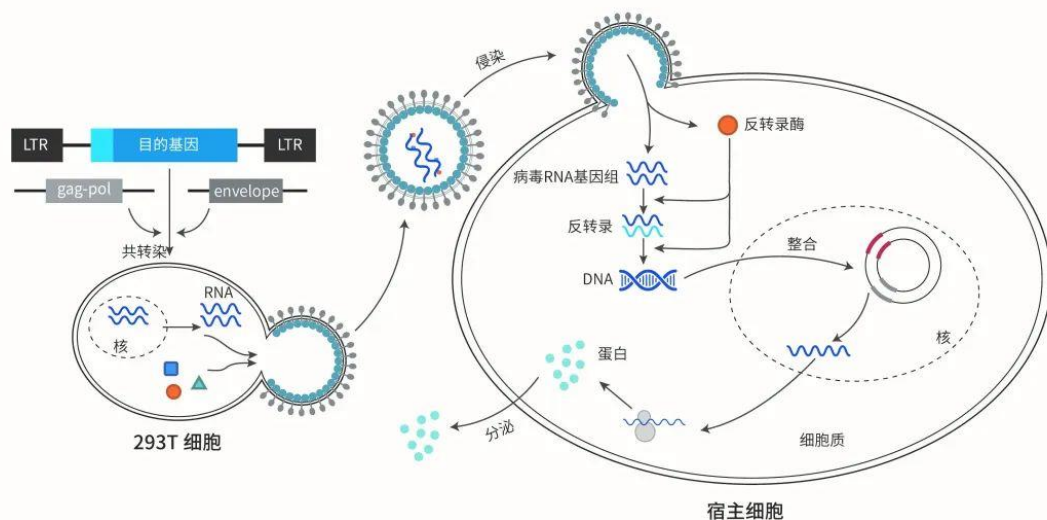
慢病毒包装手册（三）：稳转株筛选以及实验避雷+答疑

写在前面：

过去的几十年用于在培养的哺乳动物细胞中基因表达（一般是互补 DNA[cDNA]）的系统发展得越来越成熟，这些系统主要有两种类型：①用于 DNA 瞬转载体 ②病毒表达载体。

目前病毒载体主要是从四种类型的病毒发展而来：**腺病毒、腺相关病毒 AAV、慢病毒和逆转录病毒**，腺病毒和 AAV 以游离形式高效感染宿主细胞，并大量表达它们所携带的外源基因编码的蛋白质。相反，逆转录病毒和慢病毒则整合到宿主细胞基因组中。这些载体不会杀死宿主细胞，可以用于稳定转染哺乳动物细胞。没有一种细胞系是可以被所有病毒载体所感染的，而逆转录病毒有很强的种属特异性，对分裂细胞有明显偏好。

要想讲清楚慢病毒，我们先来讲讲它的前辈——**逆转录病毒**。逆转录病毒，也叫反转录病毒，属于 RNA 病毒中的一类。两端是**长末端重复序列（LTR）**，不要小瞧这两端的 LTR，它能够让**慢病毒的基因组整合到宿主基因组中**转录比较活跃的位点，而且它含有**强启动子和增强子**。那么如果我们人为地把 LTR 之间的序列替换成我们的目的基因序列，在病毒感染过程中，逆转录病毒进入宿主细胞，RNA 经逆转录酶合成双链 DNA，双链 DNA 被整合酶整合至宿主细胞基因组上，可随宿主细胞分裂传递给子代细胞。LTRs 之间的序列和包括 LTRs 在内的序列就这样被整合到宿主基因组中，还能够稳定地在细胞内表达，不就“狸猫换太子”，达成了我们的实验目的了么。



图片来源：<https://www.obiosh.com/kyfw/zl/nz1bd/669.html?1574909619>

所有的逆转录基因组都至少包括 3 个基因：

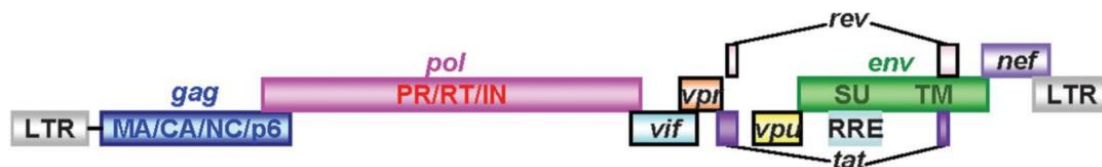
①gag 基因：编码 Gag 聚合蛋白，最终被剪切成为病毒基质、衣壳和核衣壳蛋白

②pol 基因：编码蛋白酶、反转录酶核整合酶，这部分也是逆转录病毒的核心。

③env 基因：编码一种聚合蛋白，会被病毒蛋白酶剪切成表面糖蛋白（gp70）和跨膜蛋白（p15E），也就是包膜（包膜蛋白决定了感染细胞的类型）。

目前使用的大多数逆转录病毒载体来源于莫罗尼氏鼠白血病病毒（Mo-MLV），是能够感染小鼠和人类细胞的双嗜性病毒。

铺垫了这么多，我们言归正传：好好聊聊慢病毒载体。慢病毒是逆转录病毒家族的一员，目前实验室应用最广泛的就是**基于人 I 型免疫缺陷病毒（HIV-1）的慢病毒载体**，简单来说就是 HIV 的 plus 版。虽然慢病毒是逆转录病毒家的，但是要远比逆转录病毒复杂，除了具备 3 个编码病毒基本结构的经典基因（gag、pol 和 env），它们的基因组还至少编码 6 个调节基因包括 tat、rev、vpr、vpu、nef 和 vif。tat 和 rev 主要调节病毒的转录和翻译，与病毒的 LTR 结合后促进病毒的所有基因的转录。剩下四个辅助蛋白 vif、vpr、vpu、nef 帮助病毒完成包装。



Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem J. 2012;443(3):603–618.

虽然结构复杂，但与小鼠逆转录病毒载体相比，慢病毒有两个优势：

①慢病毒基因组可以稳定整合在分裂和非分裂的细胞基因组，而小鼠逆转录病毒只能用于感染分裂活跃的靶细胞；

②慢病毒的基因毒性比小鼠逆转录病毒低得多。另外，慢病毒对于一些用传统方法很难转染的细胞如（神经细胞、原代细胞、干细胞、不分化的细胞）具有比较好优势

So 慢病毒载体设计可以用来实现哪些实验目的？

① 通过引入组织特异性启动子和/或 miRNA 靶基因实现组织特异性表达，消除脱靶效应

② 用单个载体表达多个蛋白质可以通过使用 IRES、双向启动子或由自切割的 2A 多肽分开多可读框

③ shRNA 和 miRNA 表达

④ 生成 cDNA、shRNA 和 miRNA 文库

⑤ 由药物调节的基因表达

不过一个病毒载体上有六个调节基因未免太多了，所以现在实验室用到的很多慢病毒载体，都是**根据不同的实验目的被改造过的**，最常见的比如：

①一些载体的 5' -LTR 的 U3 启动子区被 **RSV 或 CMV 启动子** 替换掉了，可以显著增加病毒滴度；

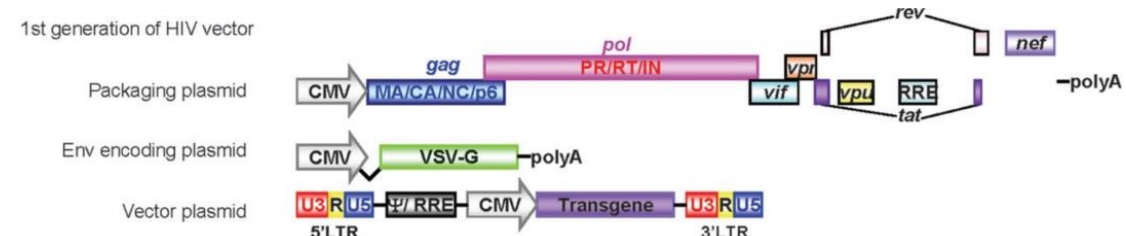
②还有些载体删掉了 3' -UTR 的 U3 启动子元件，导致整合到宿主基因组后 LTR 丧失转录活性，这些载体称为 **SIN（自灭活）**，能够降低病毒载体基因毒性

③载体加入一个 **WPRE 来源的转录后调节元件** 来增强外源基因表达（一般送公司测序的时候有时候会用到这个元件）

④HIV-1 慢病毒载体还需要 RRE，这个序列**对于病毒基因组有效运输到细胞质并高效包装是必需的**。

由此经过多年的发展，为提高慢病毒的安全性，将生产病毒所需的组件拆分为多个质粒，衍生出了一代代包装系统，在这个过程中，HIV 基因的数量也删删减减到了最少，我们简单来看一下：

第一代包装系统



包括：

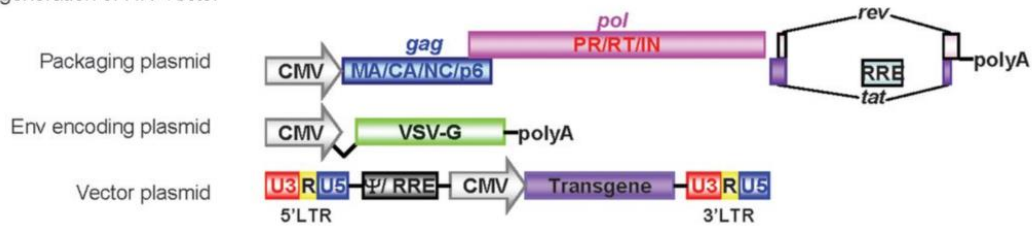
一个**穿梭质粒**：带有我们的外源目的基因

一个**包膜质粒**：Env 表达病毒糖蛋白，如 VSV-G，为载体颗粒提供受体结合蛋白。目前实验室用的慢病毒载体上的包膜蛋白一般都是把 **Env 替换成了 VSV-G**，主要是因为 VSV-G 假型慢病毒载体具有广泛的嗜性，能与细胞表面广泛存在的磷脂组分而不是一个特异性的细胞表面受体相结合，可以感染各种组织来源的细胞类型，体内、体外均可；另外 VSV-G 提高了病毒颗粒的稳定性，使病毒能禁得住高速离心的折腾

一个**包装质粒**：具有 CMV 强启动子，Gag，Pol 和调节蛋白，以产生病毒颗粒。这两质粒删掉了 LTR 和包装信号，避免它们自己包装整合到基因组以及减少制备中复制型慢病毒（RCL）的产生。

第二代包装系统

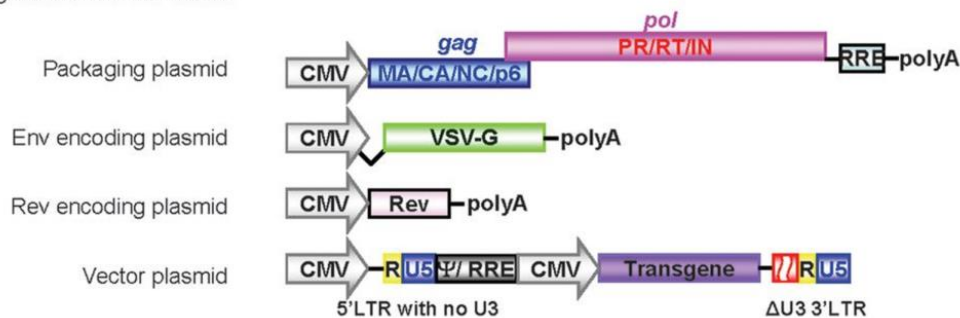
2nd generation of HIV vector



第二代在第一代的基础上，又提高了安全性。删掉了四个辅助基因：Vif、Vpu、Vpr 和 Nef。减少 HIV 毒力传播。所以二代载体仅包含九个 HIV 基因中的四个：gag+pol（结构）、tat +rev（调控）。穿梭质粒包含病毒 LTR 和 Ψ 包装信号。如果不提供内部启动子，基因表达将由 5' LTR 驱动，5' LTR 是弱启动子，需要提供 tat 的才能激活表达，正因为如此，第二代慢病毒穿梭质粒必须与第二代包装系统一起使用。

第三代包装系统

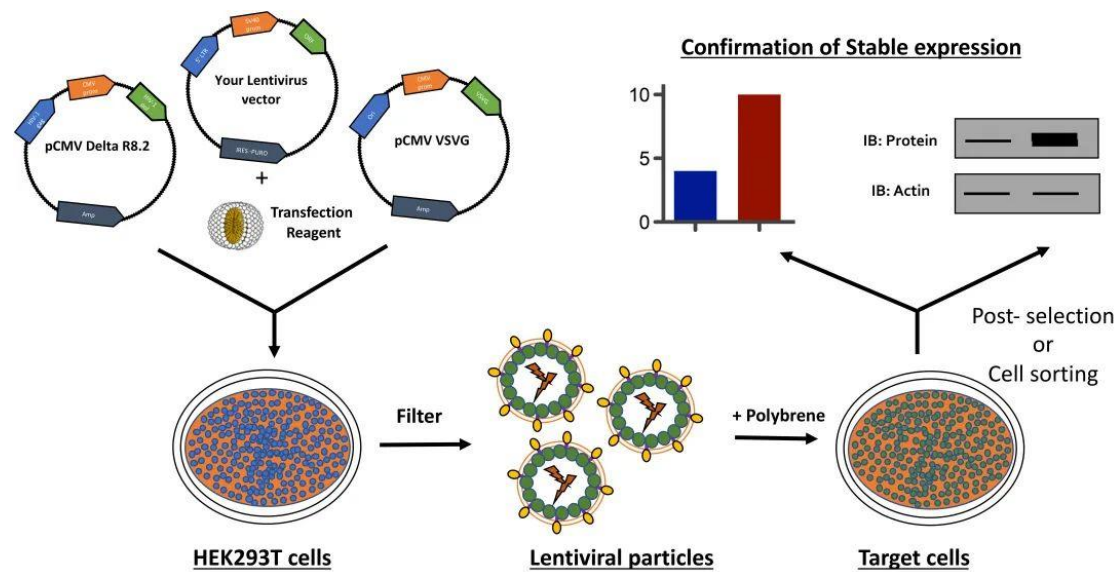
3rd generation of HIV vector



到了第三代的话又又又升级了，将包装质粒分成了两个，一个编码 rev，另一个编码 gag 和 pol。另外，穿梭质粒上还添加了跟 CMV 融合的嵌合 5' -LTR 的慢病毒载体，删掉了 tat。这样在该启动子的外源基因表达不再依赖于 tat 反式激活，所以第二代或第三代包装系统能够包装第三代穿梭质粒。第三代慢病毒系统比第二代系统更安全，但更难用，因为要用四个单独的质粒转染才能包出有功能的慢病毒颗粒。

所以总结一下，要想包出一个完整病毒，我们一般需要如下几个质粒：

- ①一个穿梭质粒：这个就是在两端 LTR 区域携带我们目的基因的“主角”，但它是复制缺陷型的，所以只有它还不够，还需要下面的辅助质粒
- ②一个或两个包装质粒
- ③一个包膜质粒



然后把这几个质粒共转进 293T 细胞，包装后的病毒将会被释放到上清液中，收集病毒上清液经浓缩后（也可以不浓缩，直接用上清液），就可以感染我们的目的细胞了。转染用 293T 细胞是因为便宜好用，而且稳定表达 SV40 大 T 抗原的细胞系，可以增加穿梭质粒 sv40 ori 的活性，转染效率高，所以是制备病毒原液的第一选择。

参考文献：

[1] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem J. 2012;443(3):603-618.

[2] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 科学出版社, 2002.

慢病毒包装手册（二）：实操——包装 protocol

Day 1

1. 准备工作要做好，转染前将 293T 细胞传到 100mm 培养皿，转染前最好要达到 80%-90% 的聚合度

（注意：用于转染的 293T 细胞状态一定要好，最好是前一天晚上铺板，待第二天到生长对数期就转染，不要等到细胞老化再转染）

Day 2

1. **A 液配制：**将以下混合质粒融在 250μL Optimem 里，这里用 Optimem 混合的原因主要是因为 Optimem 不含血清和一些有的没的蛋白，不干扰 DNA 与转染试剂形成复合物

对于每个 100mm 培养皿：

Rev	3 μ g
gp	5 μ g
VSV G	1.5 μ g
Transfer vector	10.5 μ g
TOTAL	20 μ g

（这里质粒的比例要按照自己所用慢病毒包装系统的说明书来，每个课题组都不一样，说白了你实验室一直以来包装效果还不错用的什么比例，照搬就行）

B 液配制：按每盘培养皿 PEI (1 μ g/ μ L) 量是质粒质量的 2-3 倍，溶解在 250 μ L optimem 中，吹打混匀，室温静置 A 液，B 液 5 分钟。

2.混合：将含有 PEI 的 optimem 一滴一滴加到含混合质粒的 optimem 中

3、静置 15-20min，静置好了后就不要再去晃动 Ep 管了。

4、以滴加的方式，向每皿滴入 500 μ L (250ul PEI+250ul plasmid) PEI 和 plasmid 的混合液

5、4-6 小时后换液，也可以等到第二天早上再换液（可采取半换液的方式：换一半留一半）。

Day 4（48h 收病毒，全程冰上操作）

准备：0.45 μ M 滤膜，15mL 针管，15mL 离心管, 50mL 离心管，

5 $\times$ PEG8000: NaCl 8.766 g+ PEG8000 50g 溶于 200ml Milli-Q 纯水，高温高压灭菌，保存在 4 $^{\circ}$ C。

配置时最好定容，PEG 溶解后体积会增加，一般都是配 5 $\times$ 的浓缩液，所以病毒上清与浓缩液的比例是 4:1

1、离心机提前预冷，将上清转移至 15mL 离心管，4 $^{\circ}$ C，3000rpm,离心 10min，去除细胞碎片，用针管吸取上清，用滤膜过滤至 50mL 离心管

2、剪枪头吸取 PEG8000，向病毒液中加入 1/4 体积的 5 $\times$ PEG8000，并立即颠倒混匀，放置在冰上，每 30min 颠倒 5 下，一共操作 5 次，然后静置在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜（有明显白色沉淀物即为病毒）

Day 5

1、离心机提前预冷，50mL 离心管离心 4000g，20min

2、在细胞超净台中，吸取上清液，静置 1min，再次吸取上清

3、用 200ul-400 μ L 冷的 PBS 悬浮病毒沉淀。

4、收集好的病毒立即分装到 1.5mL EP 管中，一般分装成两管，用于两次感染，冻存到-80 $^{\circ}$ C

冰箱中，待用

5、铺板靶细胞至 35mm dish 或者六孔板里，密度大约在 70%

Day 6 感染目的细胞

1、从-80℃冰箱中取出病毒液，冰上或者室温解冻都可以，不过要注意病毒液切忌反复冻融，会降低病毒滴度

2、待靶细胞生长至对数期，向病毒液中加入 polybrene，至 polybrene 终浓度在加入培养皿后达 8μg/mL。

（注意：polybrene 作为促感染试剂，可以提高感染效率，不过有的细胞对于 polybrene 很敏感，可考虑用 Protamine sulfate 替代）

3、向靶细胞培养皿中加入病毒液，晃匀后放入培养箱培养。

4、感染后注意观察细胞状态，第二天细胞长满后，可传代，待细胞再次长到对数生长期可用第二管病毒液进行二次感染。

在这里，习惯上 100mm dish 收下来的病毒感染一个 35mm dish 的目的细胞。实际上，不同的目的细胞对于病毒的感染耐受性和效果均不同，更严谨的方式是测定病毒液的感染复数 MOI，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，隐含的单位是 pfu number/cell，可以测试一系列 MOI，以确定靶细胞系中感染的最佳 MOI，然后根据这个公式添加病毒液：

MOI 值=病毒滴度（TU/mL）×病毒体积（mL）/细胞个数

当然了，还要先测一下病毒液滴度，听起来是不是麻烦很多，我也可能后面出一篇推文专门讲讲怎么测病毒滴度。不过我猜绝大部分人根本不会去测，直接去感染了，因为测滴度和不测滴度效果也没什么差别。

参考文献：

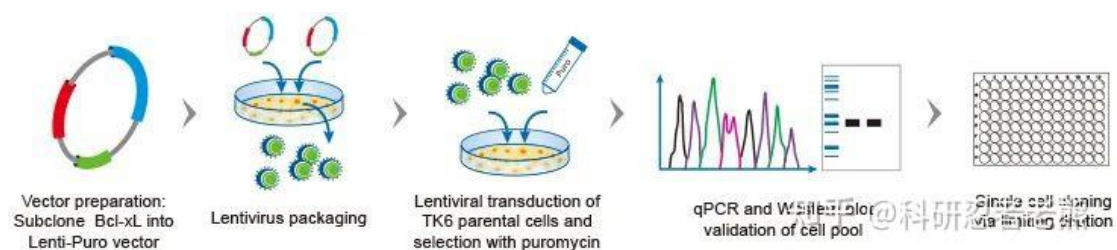
[1] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem J. 2012;443(3):603-618.

[2] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 科学出版社, 2002.

慢病毒包装手册（三）：稳转株筛选以及实验避雷+答疑

上一节我们讲了：[慢病毒包装手册（二）：实操——包装 protocol](#)，既然感染完了目的细胞，那么我们**怎么把成功感染的阳性细胞筛出来呢？**

现在实验室用的许多慢病毒穿梭质粒**具有选择标记**，如**嘌呤霉素 (puromycin)、新霉素(neomycin)**这样的抗性基因，赋予感染的目的细胞抗生素抗性。将这些抗生素添加到培养基后，未整合慢病毒基因组的细胞会被杀死，只有成功感染的阳性细胞能存活下来，这些细胞可以扩增成稳定的细胞系作为后续实验的稳转株。



如果穿梭质粒不带抗性标记怎么办？有的慢病毒穿梭载体上带 EGFP，这就更省事了，感染后直接在荧光显微镜下观察就可以大概估计出感染效率，然后用 FACS 对表达 EGFP 的细胞进行分选，分选出来的这些细胞扩增再继续扩增成稳转株。

实验过程：

一、确定感染效果（否则筛了也白筛）

1、对于直接表达 EGFP 的慢病毒，感染细胞 48-72h 后收集细胞在荧光显微镜下观察，一定要同时观察一个对照细胞，以防荧光显微镜下细胞的自发光导致的观察误差，比较好的感染效果是可以观察到 60-70% 以上的荧光。

2、对于不表达荧光的慢病毒，在感染 72h-96h 后裂解细胞，跑 PCR 或者 Western Blot 检测目的条带（**一定要有对照！**说累了都）

二、筛选稳转株

根据包装的慢病毒载体上的抗性标记进行筛选，这里以嘌呤霉素为例；

1、确定最佳嘌呤霉素浓度：每个细胞系对嘌呤霉素的敏感性不同，在开始实验之前要确定细胞系的最佳嘌呤霉素浓度

Day1: 准备六孔板或者 24 孔板，铺板目的细胞，第二天的细胞汇合度应在 80%-90%

Day2: 加入嘌呤霉素，使每个孔的嘌呤霉素终浓度在 $1\mu\text{g/ml}$ 到 $10\mu\text{g/ml}$ ，具体梯度的设置数量可以去查查目的细胞相关的文献，也可以直接设置 10 个梯度，增量为 $1\mu\text{g/mL}$

Day3: 每天检查细胞，每隔一天更换为新鲜的含嘌呤霉素的培养基，选择在三到五天后导致细胞完全死亡的嘌呤霉素的最低浓度。

2、筛选阳性混合克隆稳转株

Day1: 铺板感染后的细胞和未感染的对照细胞，至第二天汇合度在 70%-80%。

Day2: 加入前面的最佳嘌呤霉素浓度，筛选至少 48h，空细胞加 puro 组应当全部死亡，感染病毒组剩下的基本可以认为都是阳性细胞。

（**注意：**一般选择死亡超过 50%，细胞生长速度较其它皿不会明显偏低的细胞。因为细胞死亡少的话可能会有很多低表达量的细胞存在，如果细胞死亡过多，也会导致细胞扩增很慢，不利于快速获得稳定细胞株）

Day5: 降低抗生素维持浓度（相较之前的药筛浓度，浓度减至之前浓度的 $1/2 \sim 1/4$ 或更低）继续对感染后的细胞进行筛选和扩增

（**注意：**当细胞处于分裂活跃期时，抗生素作用最明显；另外，嘌呤霉素的筛选至少需要 48 h，有效浓度嘌呤霉素的筛选周期一般在 3-10 天。）

3、细胞保种、复检

- ①在扩增的过程中持续冻存保种，保证每株细胞至少冻存 6 支。
- ②冻存 2-3 后，取出一支复苏，判断细胞生长状态。

4、单克隆细胞株的筛选（根据实验目的，可选）

其实做到这很多人就不会往下继续筛了，因为一般实验混合克隆过表达或者干扰效果已经已经够用了，而且周期短，省时省力。但存在一个问题：传代次数多了后，过表达或干扰效果可能会下降，这时候就体现出单克隆细胞株的好处了，**可以保持性状单一、表达稳定**。但是挑单克隆的过程周期长，成本也唰唰唰上去了。所以还是要看根据你的实验目的来选择筛或者不筛单克隆。

实验过程：

- ①对感染并筛选后的混合克隆稳转株进行消化后接种于 96 孔板中，每孔一个细胞（可通过倍比稀释或者流式分选等方法）；
- ②标记出具有单个细胞的孔等细胞扩增后用抗性基因进行筛选；
- ③培养数天，每天观察观察，对于带荧光的慢病毒，要保证细胞株 100%发荧光，做好标记，定期换液（含有抗生素）。
- 3）筛选完毕后，同前面一样，收细胞前跑个 PCR 或 Western Blot 鉴定，鉴定结果正常的单克隆细胞冻存保种、复检。

答疑环节：对于同学们一些实验常见问题来总结回答一下

Q1、感染目的细胞后检测不到目的基因，或者看不见荧光怎么办？

A: 影响包装效果的因素有很多啦。首先要知道问题是出在包病毒这步还是感染这步。最开始想构建某个稳转细胞系时，可以先用带 GFP 的慢病毒穿梭质粒试一下，转染 293T 细胞 48h 之后，看一下细胞的荧光表达情况，如果荧光很多，可以基本排除转染这步的问题。收集病毒上清，测一下病毒滴度（是不是太低），用病毒去感染 293T 细胞，过 48h-72h 再去观察荧

光，没有的话说明共转的某一质粒可能有问题（质粒有没有去内毒素）。不排除包装过程中目的基因过表达会对 293T 细胞存在潜在毒性，总之方方面面都要考虑到，实在不行要考虑换个包装系统。

另外，我这里提一嘴 Luciferase 和 EGFP 不要放在同一个慢病毒载体上，两者放在同一个慢病毒载体时，要么 Luciferase 不能正常工作，要么 EGFP 看不到荧光。遇到这种情况，最好把 EGFP 换成抗性基因如 Puro 或者直接改用红光 mcherry。

Q2：标准上获得的未浓缩病毒滴度最好高于 1×10^7 TU/mL，浓缩后的病毒液大概为 $10^8 \sim 10^9$ ，可是我包出来的病毒滴度太低咋办？

A：首先你的目的基因长度有没有超过慢病毒载体的最大容载长度，如果超过了会大大影响病毒滴度；其次，细胞密度对于转染效率非常关键，抽提的质粒质量也非常重要，还有一个是大家会常常忽略掉的：胎牛血清 FBS 的来源和批次会显著影响转染效率（鄙人课题组曾经踩过坑，用的一批血清很耽误事，换了之后就解决了）

Q3：包装病毒后我的 293T 细胞都漂了怎么办！

A：莫慌莫慌，用 VSV-G 包膜包装慢病毒，会导致一定程度的细胞融合和脱落，尤其在第 3 天，所以换液时要非常非常的小心，解决办法就是铺板时 293T 细胞密度高一点啦，而且没事的时候不要总去折腾它看个没完。另外，还存在一点就是目的基因过表达对 293T 细胞有毒性，如果是这种情况，可以考虑用药物诱导调控的慢病毒载体，啧，麻烦。

Q4：包出来的病毒能成功感染 293T 细胞，但是感染不上我的目的细胞咋办？

A：还是包个带 EGFP 的看一下，如果 EGFP 表达很低的话，可能是启动子不行，要寻找一个在目的细胞中有更好活性的启动子。另外多查查文献，看看你用的靶细胞别人都是用的什么包膜蛋白，然后换一个包膜蛋白表达质粒，重复做一次。Addgene 上有各种各样的包膜蛋白表达质粒。这里要注意的是，在超速离心时其他假型慢病毒比 VSV-G 稳定性差，在离心过程中滴度可能有很大损失，所以要采用长时间低速离心。

Q5：慢病毒穿梭质粒可用于直接瞬转而不构稳转株么？

A：不推荐，不是全部慢病毒载体都能用于瞬转，一般第三代包装系统的穿梭质粒可以，另外由于 LTR 结构的存在可能会影响目的基因的表达。

好了，说了这么多，在此我们的慢病毒包装三部曲就更新完了：

[慢病毒包装手册（一）：前世今生——包装原理](#)

[慢病毒包装手册（二）：实操——包装 protocol](#)

希望大家都能顺顺利利构出稳转株，**点赞、转发、关注我**，让我有动力继续分享！我是老熊，一个立志用通俗易懂的语言带你玩转科研的忍者~

参考文献：

- [1] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem J. 2012;443(3):603-618.
- [2] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 科学出版社, 2002.