

microRNA down 慢病毒载体 构建和包装手册

Version4.0

吉凯基因

目 录

简 介	3
第一部分 microRNA down 慢病毒克隆的制备	4
一、实验流程	4
二、实验材料	5
三、克隆构建实例	6
四、质粒抽提	11
第二部分 慢病毒包装与质量检测	12
一、实验流程	12
二、实验材料	13
三、质粒转染与慢病毒收获	15
四、慢病毒浓缩与纯化	15
五、慢病毒质量检测	15
参考文献	21

简介

慢病毒(Lentivirus)载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载体,它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,可以在体内较长期的表达且安全性高。吉凯基因提供的慢病毒为“自杀”性病毒,即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。慢病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代,属于假型病毒。但该病毒仍然具有可能的潜在的生物学危险,吉凯基因建议不要使用编码已知或可能会致癌的基因的假型病毒,除非已经完全公认某个基因肯定没有致癌性,否则均不建议采用假型病毒进行生物学实验。

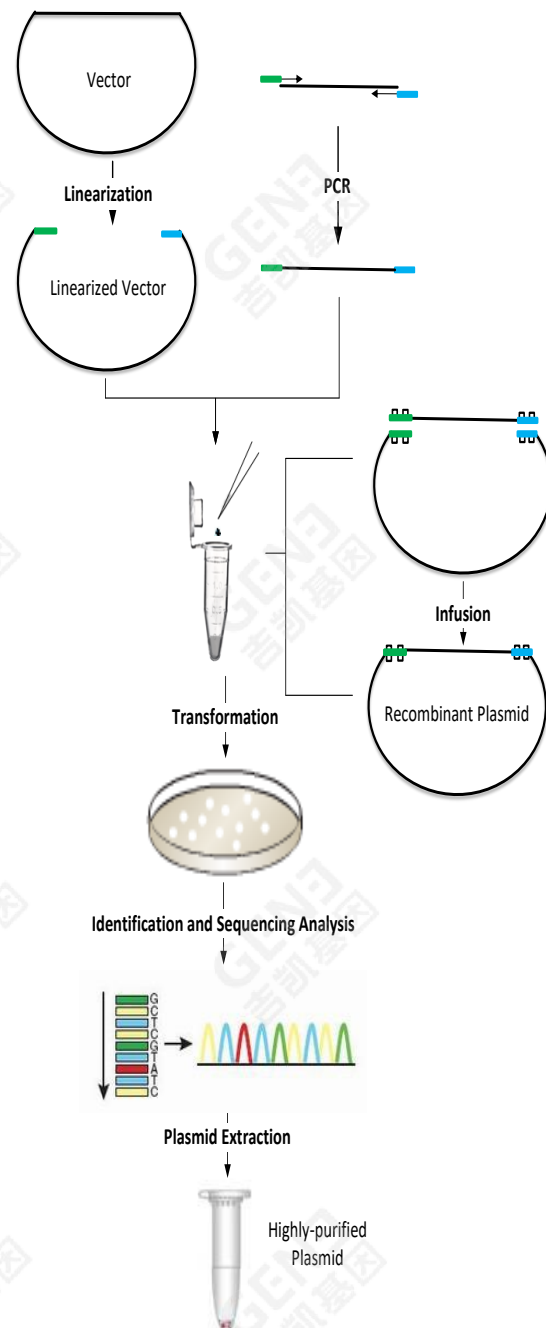
吉凯基因慢病毒载体系统由 GV 慢病毒载体系列、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体三质粒组成。GV 慢病毒载体中含有 HIV 的基本元件 5' LTR 和 3' LTR 以及其他辅助元件,例如 WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)。通常根据不同的实验目的针对 GV 载体改造以进行基因功能研究。pHelper 1.0 载体中含有 HIV 病毒的 *gag* 基因,编码病毒主要的结构蛋白; *pol* 基因,编码病毒特异性的酶; *rev* 基因,编码调节 *gag* 和 *pol* 基因表达的调节因子。pHelper 2.0 载体中含有单纯疱疹病毒来源的 VSV-G 基因,提供病毒包装所需要的包膜蛋白。

吉凯基因慢病毒产品可通过对 GV 慢病毒载体的改造和病毒包装,获得带有特定序列的慢病毒颗粒,以满足不同的实验需求。

本手册为吉凯基因 microRNA down 慢病毒载体的构建和病毒包装的通用操作流程,目的是为了给大家交流使用,部分细节内容未能做到——详述,敬请谅解。同时希望大家能够针对手册中的错误和问题,提出宝贵的意见。

第一部分 microRNA down 慢病毒克隆的制备

一、实验流程



利用限制性内切酶消化获得线性化载体。引物退火制备目的片段。所设计引物在其两端添加酶切位点（图中以绿色和蓝色标记）。该引物退火后与线性化克隆载体两末端含有相同的酶切位点。以线性化载体和退火产物配制反应体系，进

行连接反应，产物直接进行转化。挑取平板上的单克隆进行 PCR 鉴定，对阳性克隆进行测序及结果分析。将正确克隆菌液扩大培养、抽提，获得高纯度质粒，用于下游病毒包装。

二、实验材料

1. 主要试剂

试剂名称	试剂来源	Cat. No.
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM0311
NormalRun™ 250 bp-II DNA Ladder	GeneRay	#DL2502
Restriction Endonuclease	NEB	
Taq Plus DNA polymerase	Vazyme	#P201-D3
T4 DNA ligase	Thermo Scientific	#EL0016
Primer	GeneRay	
TOP10 competent cell	Genechem	
EndoFree midi Plasmid Kit	TIANGEN	#DP118-2

2. 主要仪器

仪器名称	仪器来源	Cat. No.
PCR 仪	Applied Biosystems 公司	2720 Thermal Cycler
测序仪	美季生物公司	ABI3730
数显式稳压稳流电泳仪	天能公司	EPS 200
凝胶成像仪	天能公司	Tanon-2500
细菌摇床	华利达实验设备公司	HZ-9211K
Blue Pard 隔水式恒温培养箱	上海一恒科学仪器有限公司	GHP-9080
移液器	吉尔森公司	
超净工作台	苏州佳宝净化工程设备有限公司	JB-CJ-2FX
高速离心机	Thermo Scientific	Legend Micro 17

三、克隆构建实例

以 hsa-mir-146b-5p 为例描述详细实验过程

1. MicroRNA 及工具载体信息

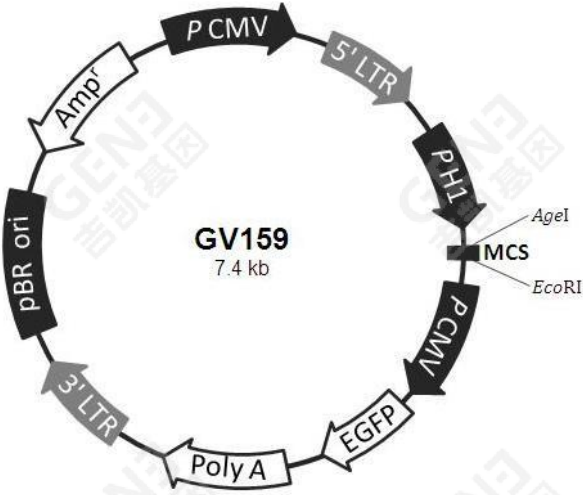
1.1 MicroRNA 信息:

Micro 名称: hsa-mir-146b-5p

Accession: MIMAT0002809

Organism: Human

1.2 工具载体:

载体图谱	载体说明
	载体编号: GV159 元件顺序: H1-MCS-CMV-EGFP 荧光标记: EGFP 克隆位点: <i>Age</i>I、<i>Eco</i>R I

2. 载体酶切

根据如下列表，配制 50 μl 酶切体系。按列表顺序依次加入各种试剂，用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心，置于 37°C¹ 反应 3 h 或过夜。对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收目的条带。

试剂	体积(μl)
ddH ₂ O	41
10×CutSmart Buffer ²	5
纯化的质粒 DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2
<i>Age</i> I (10 U/ μl)	1
<i>Eco</i> R I (10 U/ μl)	1
Total	50

¹ 大部分限制性内切酶的最适反应温度为 37°C，但也有一些不是 37°C，例如 *Apa*I 为 25°C，*Bsi*I 为 75°C。根据所需限制性内切酶确定相应的反应温度。

² 限制性内切酶在选定的 Buffer 下应该具有不低于 50% 的反应活性。各种限制性内切酶在不同 Buffer 下的具体活性请参考其说明书。

载体酶切结果：

载体酶切电泳图谱	电泳图说明
	1#: GV159 Vector 2#: <i>Age</i>I & <i>Eco</i>R I digested GV159 Vector 3#: 1 kb DNA Ladder (条带从上到下依次为：10 kb、8 kb、6 kb、5 kb、4 kb、3.5 kb、3 kb、2.5 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp)

3. 目的基因片段的获取

3.1 合成单链引物

ID	Seq (5' → 3')
hsa-miR-146b-5p-inhibition(4658-1)-1	aattcaaaaaTGAGAACTGAATTCCATAGGCT
hsa-miR-146b-5p-inhibition(4658-1)-2	CcggAGCCTATGGAATTCAGTTCTCATTTTTg

3.2 引物退火形成双链 DNA

合成后成对的引物干粉溶解于退火缓冲液中, 90°C水浴 15 min, 自然冷却至室温, hsa-miR-146b-5p-inhibition(4658-1)-1 与 hsa-miR-146b-5p-inhibition(4658-1)-2 理论配对结果如下:

```

5'- AATTCAAAAATGAGAACTGAATTCCATAGGCT-3'
      |||||
3'-GTTTTTACTCTTGACTTAAGGTATCCGAGGCC-5'
  
```

注: TTTTT 是终止信号。

4. 退火产物与载体进行连接

通过 T4 DNA ligase 将双酶切线性化的载体和退火双链 DNA 连接, 16°C连接 1-3 h, 或连接过夜。

反应体系:

试剂	体积(μl)
线性化载体 (100 ng/μl)	1*
双链 DNA (100 ng/μl)	1
10 × T4 DNA ligase 缓冲液	2
T4 DNA ligase	1
dd H ₂ O	补足至 20

* 根据载体大小做相应调整

5. 转化

将 10 μL 交换反应产物加入到 100 μL 感受态细胞中, 轻弹管壁数下混匀, 在冰上放置 30 min。42°C热激 90 s, 冰水浴孵育 2 min。加入 500 μL LB 培养基, 置于 37°C 摇床振荡培养 1 h。取适量菌液均匀涂布在含有相应抗生素的平板上, 在恒温培养箱中倒置培养 12-16 h。

6. 菌落 PCR 鉴定

6.1 引物

ID	Seq (5' → 3')
鉴定引物-F	GGAAAGAATAGTAGACATAATAGC
鉴定引物-R	CCGGAGCCTATGGAATTCAGTTCTCATTTTTg

说明：鉴定引物-F 位于载体上，鉴定引物-R 是用于退火的下游单链引物 hsa-miR-146b-5p-inhibition (4658-1)-2，用于菌落 PCR 鉴定转化子。

6.2 PCR 鉴定

配制如下反应体系，震荡混匀，短暂离心。在超净工作台中，用无菌的枪头挑取单个菌落至 20 μL 鉴定体系中，吹打混匀，置于 PCR 仪中进行反应。

鉴定反应体系：

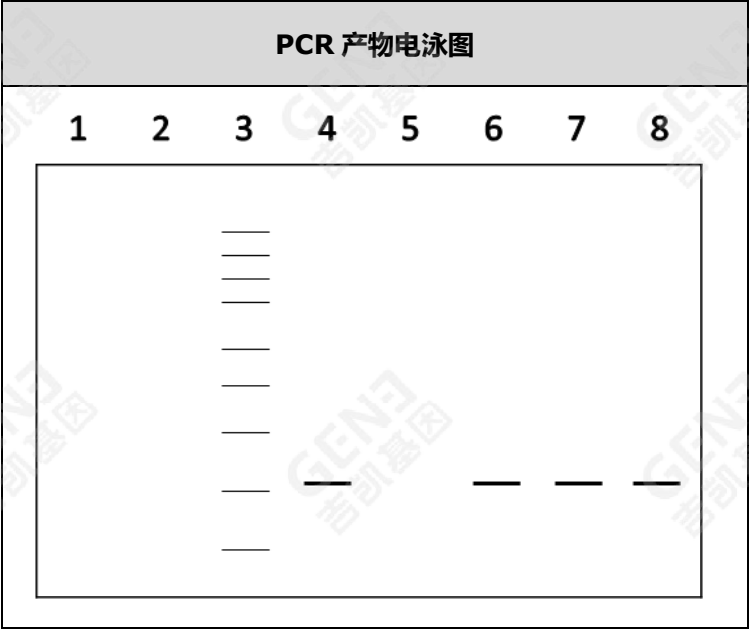
试剂	体积 (μL)
ddH ₂ O	9.2
2×Taq Plus Master Mix	10
上游引物 (10 μM)	0.4
下游引物 (10 μM)	0.4
单菌落	-
Total	20

PCR 反应条件：

1 Cycle	22 Cycles			1 Cycle	1 Cycle
94°C	94°C	55°C ¹	72°C	72°C	4°C
3 min	30 s	30 s	30 s ²	5 min	∞

- ¹ 退火温度依据引物或基因 GC 含量而定，退火温度一般设定比引物的 T_m 低 5°C。
- ² 延伸时间依据鉴定 PCR 产物的长度而定。Taq Plus DNA 聚合酶延伸时间按 1 Kb/min 计算。

6.3 鉴定结果



样品说明:

泳道	样品编号
1 #	空白对照 ¹
2 #	阴性对照 ²
3 #	250bp DNA Ladder (条带从上至下依次为 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp)
4 #-8 #	1-5 号转化子

¹ 空白对照以 ddH₂O 为模板，用于检测鉴定体系是否存在污染。

² 阴性对照以未插入目的基因的空载体为模板，用于证明扩增过程中无假阳性现象。

7. 测序

将鉴定出的阳性克隆转化子接种于适量含相应抗生素的 LB 液体培养基中，37℃培养 12-16 h，取适量菌液进行测序。对测序结果与目的基因序列进行比对分析。比对结果如下：

CAAATCAACTAAAGATTACAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACA
GGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAGTACCGGGCCCGCTCTAGACTCGAGATATTT
GCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTGGG
AATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCACCGGAGCCTATGGAATTCAGTTCTCATT
TTGAATTCGGATCCATTAGGCGGCCGCGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGT
TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT
ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTG

ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG
CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCC
CAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC
TATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGAC
TCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACC
AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG
GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTC
AGATCCGCTAGCGCTACCGGACGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA
CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTC
AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGT
TCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCT

比对结果说明：测序结果与目标序列完全一致

四、质粒抽提

将测序正确的菌液转接于 10 ml 含相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37°C 培养过夜, 用天根无内毒素质粒小提中量试剂盒进行质粒抽提, 抽提合格的质粒进入下游流程。详细操作步骤如下:

1. 收集过夜培养的菌液于标记好的 5 ml 离心管, 12000 rpm, 离心 2 min 收菌;
2. 弃上清, 加入 250 μ l 细胞重悬液, 充分振荡, 使菌块悬浮均匀;
3. 加入 250 μ l 细胞裂解液, 再加入 10 μ l 蛋白酶 K, 上下颠倒 5-6 次, 轻轻混匀; 静置 1-2 min, 致使菌体裂解澄清;
4. 加入 350 μ l 中和液, 上下颠倒混匀, 使蛋白完全析出, 冰浴静置 5 min;
5. 10000 rpm 离心 10 min, 弃蛋白, 收集上清于另一干净无菌的 1.5 ml EP 管;
6. 12000 rpm 离心 5 min, 同时准备标记好的回收柱, 将上清转移至回收柱中, 12000 rpm 离心 1 min, 弃下层废液;
7. 加入 600 μ l 预先配置好的漂洗液, 12000 rpm 离心 1 min, 弃下层废液, 重复一次, 12000 rpm 空离 2 min, 进一步除去残留的漂洗液;
8. 在超净台中将回收柱转移至新的 1.5 ml EP 管中, 静置 10-20 min, 自然晾干;
9. 往回收柱中加入 95 μ l Nuclease-Free Water, 静置 2 min, 12000 rpm 离心 2 min, 收集样品做好编号, 电泳、测定浓度, 进行质检。

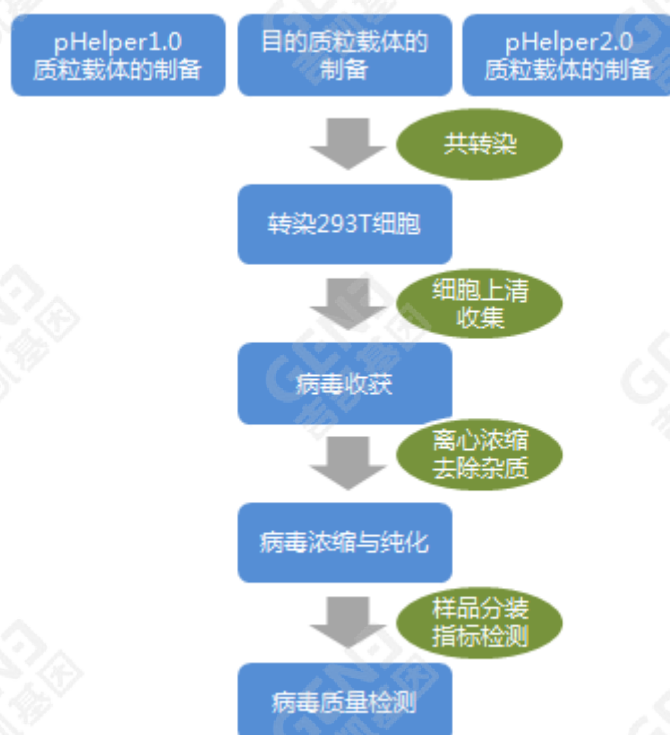
第二部分 慢病毒包装与质量检测

一、实验流程

吉凯采用内部研发的二代自失活型慢病毒包装系统完成包装过程。病毒包装共涉及三个质粒，分别为：

- ✧ 携带目的基因或靶点序列的工具载体质粒（吉凯推荐 GV115、GV118、GV365 载体等）
- ✧ 病毒包装辅助质粒（Helper 1.0）
- ✧ 病毒包装辅助质粒（Helper 2.0）

我们采用三质粒共转染 293T 细胞，在转染完成后的 48-72h 进行病毒收获（即未纯化的细胞上清液），根据不同的实验需求，确定采用相应的浓缩纯化方式得到高滴度的慢病毒保存液，最后根据严格的质量标准测定慢病毒的各项指标。在一定滴度范围内的慢病毒颗粒可以满足大部分体内外实验需求，流程图如下。



二、实验材料

1. 细胞株

293T, 慢病毒的包装细胞, 为贴壁依赖型上皮样细胞, 生长培养基为 DMEM(含 10% FBS)。贴壁细胞经培养生长增殖形成单层细胞。

2. 菌株

大肠杆菌菌株 DH5 α , 用于扩增慢病毒载体和辅助包装载体质粒。

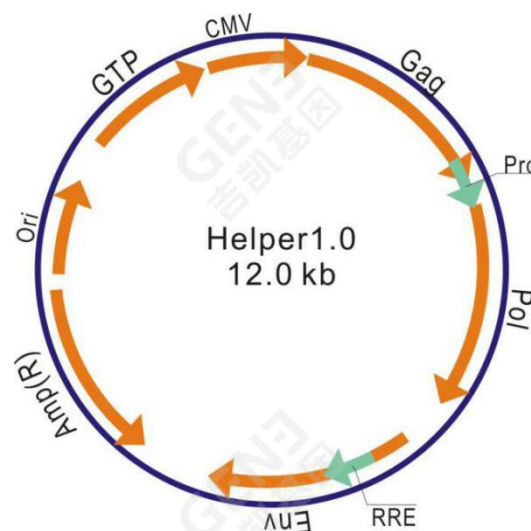
3. 病毒载体

1)GV 载体图谱:

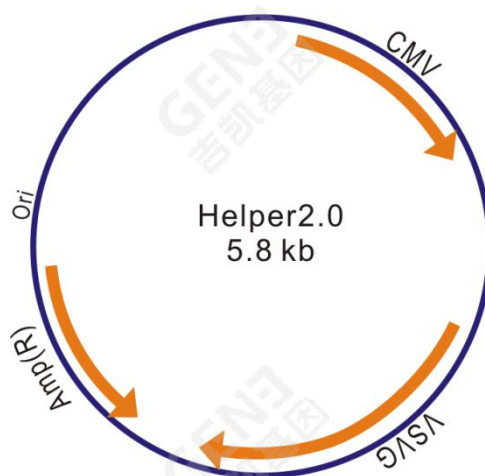
具体结构请参考“第一部分 慢病毒克隆的构建”

或参见 <http://www.genechem.com.cn/Zaiti.aspx?zt=GV> (输入 GV 载体号)

2)pHelper 1.0 载体图谱:



3) pHelper 2.0 载体图谱:

**质粒的制备（病毒包装的质粒尽可能采用去内毒素质粒抽提试剂盒抽提）：**

以 Qiagen 公司的质粒抽提试剂盒提取慢病毒包装系统中三种质粒 DNA，质粒 DNA 溶于除菌的 TE 中，以紫外光吸收法测定其浓度及纯度，保证所提质粒 DNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.8-2.0 之间。

4. 试剂

试剂名称	试剂来源	Cat.No.
台盼兰	SIGMA	72-57-1
胎牛血清 FBS	上海微科生化试剂有限公司	A11-102
DMSO	上海试一化学试剂有限公司	130701
DMEM	Hyclone	SH30022.01B
胰酶	生工生物工程（上海）股份有限公司	T0458-50G
吉凯转染试剂	吉凯公司内部配制	
puromycin	Sigma-Aldrich	P9620
HIV-1 p24 Antigen ELISA 2.0 试剂盒	北京达科为生物技术有限公司	0801002

5. 仪器

仪器名称	仪器来源	Cat.No.
荧光显微镜	奥林巴斯	micropublisher 3.3RTV
细胞培养箱	日本三洋 SANYO	MCO-175
生物安全柜	上海振祥创空气净化设备有限公司	Bio 1200-II-A2
超速离心机	Beckman	XE-90

三、质粒转染与慢病毒收获

1. 转染前 24 h, 用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞, 以含 10% 血清的培养基调整细胞密度约 5×10^6 细胞/15 ml, 重新接种于 10 cm 细胞培养皿, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。24 h 待细胞密度达 70%~80% 时即可用于转染;
2. 转染前 2 h 更换为无血清培养基;
3. 向一灭菌离心管中加入所制备的各 DNA 溶液(GV 载体质粒 20 µg、pHelper 1.0 载体质粒 15 µg、pHelper 2.0 载体质粒 10 µg), 与相应体积的吉凯转染试剂混合均匀, 调整总体积为 1 ml, 在室温下温育 15 min;
4. 混合液缓慢滴加至 293T 细胞培养液中, 混匀, 于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养;

注: 加入过程一定要均匀, 尽可能地不要将细胞吹起。

5. 培养 6 h 后弃去含有转染混和物的培养基, 加入 10 ml 的 PBS 液清洗一次, 轻柔晃动培养皿以洗涤残余的转染混和物后倒弃;
6. 缓慢加入含 10% 血清的细胞培养基 20 ml, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱内继续培养 48-72 h。

四、慢病毒浓缩与纯化

1. 根据细胞状态, 收集转染后 48 h (转染即可计为 0 h) 的 293T 细胞上清液;
2. 于 4°C、4000 g 离心 10 min, 除去细胞碎片;
3. 以 0.45 µm 滤器过滤上清液于 40 ml 超速离心管中;
4. 分别配平样品, 将带有病毒上清液的超速离心管逐一放入至 Beckman 超速离心机内, 设置离心参数为 25000 rpm, 离心时间为 2 h, 离心温度控制在 4°C;
5. 离心结束后, 弃去上清, 尽量去除残留在管壁上的液体, 加入病毒保存液 (可用 PBS 或细胞培养基替代), 轻轻反复吹打重悬;

注: 该步骤病毒回收会存在一定程度损失, 尽可能地避免病毒长时间暴露在室温中。

6. 经充分溶解后, 高速离心 10000 rpm、5min 后, 取上清按要求分装;
7. 准备样品待检测。

五、慢病毒质量检测

慢病毒的质量控制要点包括物理状态检测、无菌检测及病毒滴度检测。

1. 物理指标检测

- 1) 颜色判定: 通过肉眼判定, 吉凯公司研发的慢病毒保存液呈粉红色澄清液体状;

- 2) 粘稠度判定：用 20-200 μl 规格移液器缓慢吸取 50 μl 慢病毒保存液体，无明显粘稠感或吸液滞后现象；

2. 无菌检测

将病毒加入 293T 细胞验证，正常培养 24 h 后镜检，无任何细菌及真菌污染情况，同时参照空细胞组，细胞间隙无明显颗粒存在，培养基澄清透明。

3. 滴度检测

A 荧光法测定滴度

- 1) 测定前一天，使用 293T 贴壁细胞铺板，96 孔板，每孔 4×10^4 个细胞，体积 100 μl ；
- 2) 根据病毒的预期滴度，准备 7-10 个无菌的 EP 管，每管中加入 90 μl 无血清培养基；
- 3) 取待测定的病毒原液 10 μl 加入到第一个管中，混匀后，取 10 μl 加入到第二个管中，继续相同的操作直到最后一管；
- 4) 选取所需的细胞孔，弃去 90 μl 培养基，加入 90 μl 稀释好的病毒溶液，培养箱培养；
- 5) 24 h 后，加入完全培养基 100 μl ，小心操作，不要吹起细胞；
- 6) 4 天后，观察荧光表达情况，荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少。

B 药筛法测定滴度

1-5 步骤与“荧光法测定滴度”相同，感染后 72 h 加入抗性药物 puromycin，维持药物浓度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。继续培养 1 天，观察细胞生长状况。

病毒样品稀释说明：

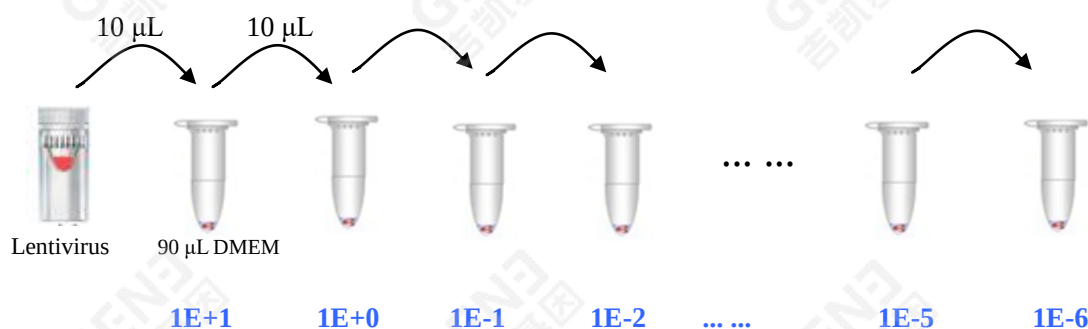


图 1 病毒稀释过程

第一个 EP 管中加入 10 μl 病毒原液，记为 1E+1 μl ；第二个 EP 管中进行了第一次十倍稀释，所得病毒原液为第一个 EP 中的 1/10，记为 1E+0 μl ；依次类推...第八个

EP 管中进行了第七次十倍稀释，记为 1E-6 μ l，如图 1。

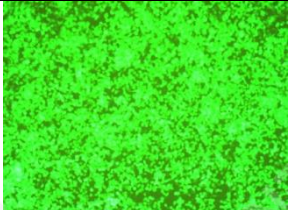
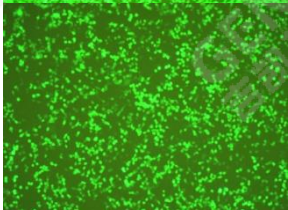
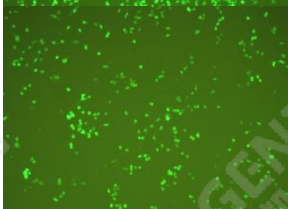
滴度分析

若为荧光标记的慢病毒，根据荧光图片中 GFP 表达情况，如图 2，在 1E-6 μ l 病毒原液感染孔中观察到 2 个荧光细胞，说明该孔中至少有 2 个病毒颗粒感染了细胞，则

病毒滴度=荧光细胞数/病毒原液量=2/(1E-6)=2E+6 (TU/ μ l)=2E+9 (TU/ml)

若为带有 puromycin 抗性的慢病毒，通过感染后的活细胞数量来计算病毒滴度。例如在加入 1E-5 μ l 病毒原液的孔中观察到 3 个细胞存活，说明该孔中至少有 3 个病毒颗粒感染了细胞，则

病毒滴度=活细胞数/病毒原液量=3/(1E-5)=3E+5 (TU/ μ l)=3E+8 (TU/ml)

样品组	明视野 100x	荧光视野 100x
1E+0 μ l		
1E-1 μ l		
1E-2 μ l		
1E-3 μ l		
1E-4 μ l		

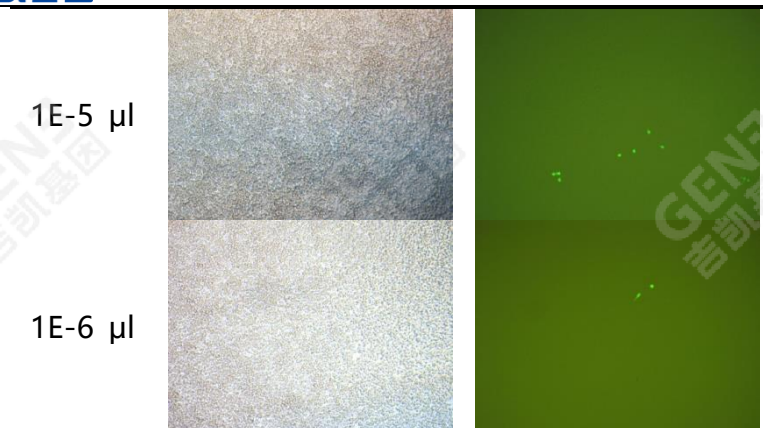
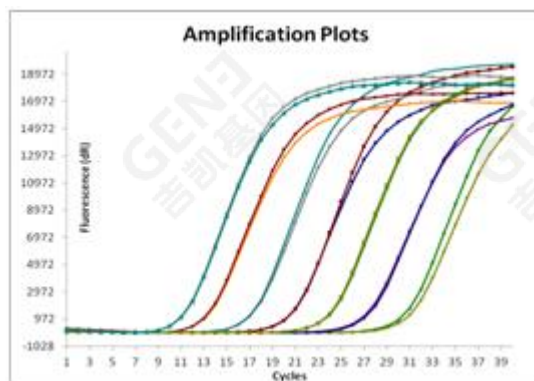


图 2 滴度荧光照片[仅供参考]

C 绝对定量 qPCR 法

方法原理



慢病毒可以将病毒的 5' LTR—3' LTR 区整合入宿主基因组中稳定表达，通过病毒感染工具细胞 293T，用绝对定量方法检测出工具细胞 293T 基因组中的病毒特征单拷贝基因 A 和宿主特征单拷贝基因 B。计算出每个细胞中平均感染病毒颗粒数，再乘以每孔的细胞个数，除以感染量，即可得出病毒样品的滴度。

计算公式：qPCR 滴度 (TU/ml) = $N \cdot C / V$

N=感染时 24 孔板中对应孔的细胞数量；

C (每个细胞中含有的慢病毒个数) = (A 拷贝数/B 拷贝数) * 2；

V=对应孔中感染的慢病毒体积 (ml)。

标注品制备

实验步骤：

1) 标准品制备：构建含有慢病毒基因组保守序列 a 的质粒标准品 A 和含有工具细胞 293T 基因组内单拷贝基因 b 的质粒标准品 B；浓度 $1E+10$ copy/ μ l，分装后-80℃长久保存。

2) 引物设计和制备：分别设计针对质粒标准品 A 和 B 设计 qPCR 引物，并配置成 10 μ M 的引物工作液。

3) 样品制备：

a) 感染前 24h，在 24 孔板中养 293T 细胞，密度为 $5E+4$ cell/孔。

- b) 感染时，收集 2-3 孔空细胞，分别计数每孔内感染时细胞总数 N，
每孔感染病毒体积 V ml，每个病毒感染 3 个复孔。
- c) 感染后 24h，每孔加入 1000 μ l 完全培养基，小心操作，不要吹起细胞。
- d) 感染后 72h，吸去上清，荧光拍照；同时分别收集孔内细胞。
- e) 用天根《细胞、血液基因组提取试剂盒》提取收集细胞的基因组。

4) 标准品稀释：

10 倍梯度稀释法，以 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 梯度稀释质量标准品 A 和 B，以及待测样品。

5) 配制 PCR 反应体系：

根据下列比例分别配制含有 a 和 b 基因 qPCR 引物的反应体系：

试剂名称	1 $\times$ (μ l)	n $\times$ (μ l)
Takara Mix	10	10n
Forward primer	0.5	0.5n
Reverse primer	0.5	0.5n
ddH ₂ O	7	7n
template	2	

6) PCR 反应：

设定程序为两步法 Real-Time 定量。预变性 95 $^{\circ}$ C，15s，之后每一步变性 95 $^{\circ}$ C，5s，退火延伸 60 $^{\circ}$ C，30s，共进行 40 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。

PCR 结束后，制作溶解曲线，在 95 $^{\circ}$ C 变性 1min，然后冷却至 60 $^{\circ}$ C，1min，使 DNA 双链充分结合。从 60 $^{\circ}$ C 开始，每步增加 0.5 $^{\circ}$ C，保持 30s，同时读取吸光值。

Segment 1: (1x)
Step 1: 95 $^{\circ}$ C for 15s
Segment 2: (40x)
Step 1: 95 $^{\circ}$ C for 5s
Step 2: 60 $^{\circ}$ C for 30s
Data collection and Real-Time analysis enabled
Segment 3: (1x)
Step 1: 95 $^{\circ}$ C for 60s
Step 2: 60 $^{\circ}$ C for 60s
Step 3: 60 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C for 30s, +0.5 $^{\circ}$ C/step

7) 滴度结果

样品	V (μl)	A	B	C	N	滴度	平均滴度
Sample	1	1.00E+04	1.00E+04	2.00	1.00E+05	2.00E+08	2.00E+08
	1	9.00E+03	9.50E+03	1.89	1.00E+05	1.89E+08	
	1	1.10E+04	1.05E+04	2.09	1.00E+05	2.09E+08	

根据计算公式: $\text{qPCR 滴度 (TU/ml)} = N \cdot C / V$, 计算样品的平均滴度。

参考文献

1. Theophilus S, Vijaykumar, Avindra Nath, and Ashok Chauhan, "Chloroquine mediated molecular tuning of astrocytes for enhanced permissiveness to HIV infection," *Virology* 2008 November 10; 381(1): 1-5.
2. Cherie T Ng et al., "Passive neutralizing antibody controls SHIV viremia and enhances B cell responses in infant macaques," *Nat Med.* 16, 2010 October ;10: 1117-1119.
3. Manuel A. F. V. Gonçalves et al., "Rapid and Sensitive Lentivirus Vector-Based Conditional Gene Expression Assay to Monitor and Quantify Cell Fusion Activity," *PLoS ONE*. 2010 June 3; 5(6): 0010954.
4. heng J, Shen WH, Lu TJ, Zhou Y, Chen Q, Wang Z, Xiang T, Zhu YC, Zhang C, Duan S, Xiong ZQ. Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *J Biol Chem.* 2008 May 9;283(19):13280-8.
5. Zheng J, Shen WH, Lu TJ, Zhou Y, Chen Q, Wang Z, Xiang T, Zhu YC, Zhang C, Duan S, Xiong ZQ. Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *J Biol Chem.* 2008 May 9;283(19):13280-8.
6. Zhang H, Feng W, Liao W, Ma X, Han Q, Zhang Y. The gp130/STAT3 signaling pathway mediates beta-adrenergic receptor-induced atrial natriuretic factor expression in cardiomyocytes. *FEBS J.* 2008 Jul; 275(14):3590-7.
7. Sun Y, Liu M, Yang B, Li B, Lu J. Role of siRNA silencing of MMP-2 gene on invasion and growth of laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008 Nov; 265(11): 1385-91.
8. Lizee, G., Aerts, J. L., Gonzales, M. I., Chinnasamy, N., Morgan, R. A., & Topalian, S. L. (2003). Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Human Gene Therapy*, 14, 497-507.
9. Giry-Laterrière, M., Verhoeyen, E., & Salmon, P. (2011). Lentiviral vectors. *Methods in Molecular Biology*, 737, 183-209

更多吉凯慢病毒相关文章信息，请登录吉凯网站获取：<http://www.genechem.com.cn/>