

RNAi 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 RNAi 慢病毒克隆的制备	4
一、实验流程	4
二、实验材料	5
三、RNAi 靶点设计	6
四、克隆构建实例	6
五、质粒抽提	11
第二部分 慢病毒包装与质量检测	13
一、实验流程	13
二、实验材料	14
三、质粒转染与慢病毒收获	16
四、慢病毒浓缩与纯化	16
五、慢病毒质量检测	16
参考文献	错误!未定义书签。

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。

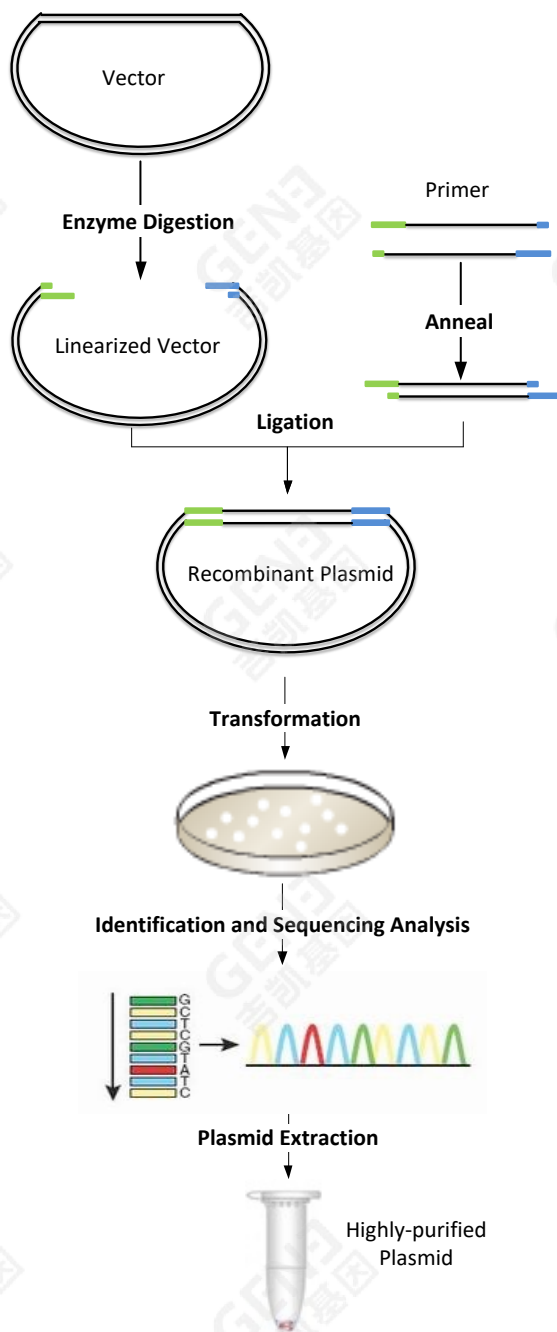
吉凯基因慢病毒载体系统由 GV 慢病毒载体系列、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体三质粒组成。GV 慢病毒载体中含有 HIV 的基本元件 5' LTR 和 3' LTR 以及其他辅助元件,例如 WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)。通常根据不同的实验目的针对 GV 载体改造以进行基因功能研究。pHelper 1.0 载体中含有 HIV 病毒的 *gag* 基因,编码病毒主要的结构蛋白;*pol* 基因,编码病毒特异性的酶;*rev* 基因,编码调节 *gag* 和 *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 RNAi 慢病毒载体的构建和病毒包装的通用操作手册,目的是为了更方便大家交流使用,部分细节内容未能做到一一详述,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 RNAi 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、RNAi 靶点设计

针对目的基因序列，根据 RNAi 序列设计原则，设计多个 RNAi 靶点序列，选择最佳的动力学参数靶点进入后续实验流程。除了自行设计的 RNAi 靶点序列之外，我们也使用一些 RNAi 实验中公认序列，比如 RNAi 阴性对照(Negative Control, NC) Scramble 序列：TTCTCCGAACGTGTCACGT。同时，RNAi 靶点序列亦可由客户提供，我们将根据客户的不同要求将靶点序列构建到相应的慢病毒载体上。

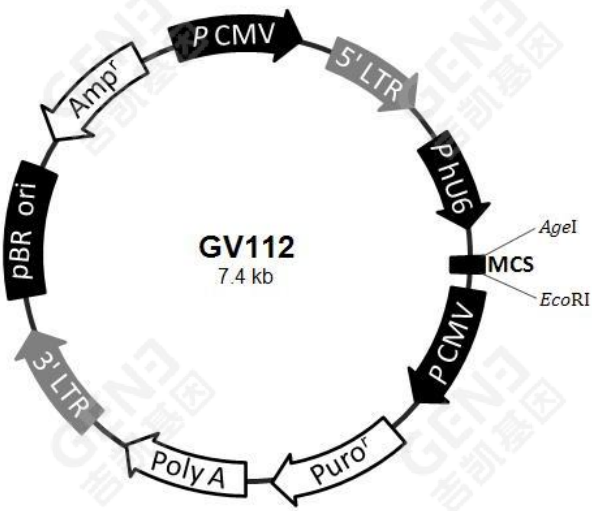
四、克隆构建实例

以构建 RNAi 阴性慢病毒对照为例描述详细实验过程

1. 目的基因及工具载体信息

1.1 基因信息：Scramble 序列

1.2 工具载体：

载体图谱	载体说明
	载体编号：GV 112 元件顺序：hU6-MCS-CMV-puro^r 克隆位点：Age I、EcoR 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°C 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 μg/μL)	2
<i>Age</i> I (10 U/μl)	1
<i>Eco</i> R I (10 U/μl)	1
Total	50

- 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。
- 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#: GV112 Vector 2#: 经过 <i>Age</i>I 和 <i>Eco</i>R I 酶切的 GV112 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 核心序列

NO.	GENE	SOURCE	Target Sequence
1	NC	None	TTCTCCGAACGTGTCACGT

该序列在多篇文章中使用，在 google 中 search 以上序列，可以得到部分文献，本手册仅列举如下：

[Overexpression of PKCα is Required to Impart Estradiol Inhibition ...](#)

GATCCCC(TTCTCCGAACGTGTCACGT)TTCAAGAGA(ACGTGACACGTTCCGAGAA)T ...
 5'AGCTTTTCCAAAAA(TTCTCCGAACGTGTCACGT)TCTCTTGAA(ACGTGACACGTTCCGAGAA)GGG-3'. ...
carcin.oxfordjournals.org/cgi/reprint/bgl002v1.pdf

[Importin 7 May Be Dispensable for Human Immunodeficiency Virus ...](#)

... [5]) or a nonspecific control (NS; 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'; QIAGEN or Ambion) siRNA in OptiMEM (Invitrogen) using Oligofectamine reagent (Invitrogen). ...
www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?&pubmedid=16103209

[Biochemical and Biophysical Research Communications : NF-κB ...](#)

The control virus Ad-siNT, in which the A-p50 minigene was replaced with this sequence (5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3') that has no known target (NT) in the ...
linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X07010819

将该 NC 序列在 genbank 中进行比对,结果仅和 Zebrafish 的两个基因有连续 16 个碱基的同源性,除此外和基因组中的任何序列没有连续 16 个碱基的同源性,因此可以用做普适型阴性对照。

3.2 病毒载体构建框架

NO.	5'	STEM	Loop	STEM	3'
GV112-NC-1	CCGG	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGAGAA	TTTTTG
GV112-NC-2	AATTCAAAAA	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TCTCTTGAA	ACGTGACACGTTCCGAGAA	

说明: 由于部分客户的特殊需要, STEM 的碱基数量和 LOOP 的序列可能与本例中有所差异, 请以具体的实验报告中的序列为准。

3.3 合成单链引物

ID	Seq (5' → 3')
GV112-NC-1	5' -CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAA CGTGACACGTTCCGAGAAATTTTG-3'
GV112-NC-2	5' -AATTCAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTT GAAACGTGACACGTTCCGAGAA-3'

3.4 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, GV112-NC-1 与 GV112-NC-2 理论配对结果如下:

```

5'-CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAAATTTTG-3'
|||||
3'-AAGAGGCTTGCACAGTGCAAAGTTCTCTTGCACTGTGCAAGCCTCTTAAAAAATTAA-5'
  
```

注: TTTT 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 1-3h，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	CCATGATTCCTTCATATTGC
鉴定引物-R	GTAATACGGTTATCCACGCG

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：

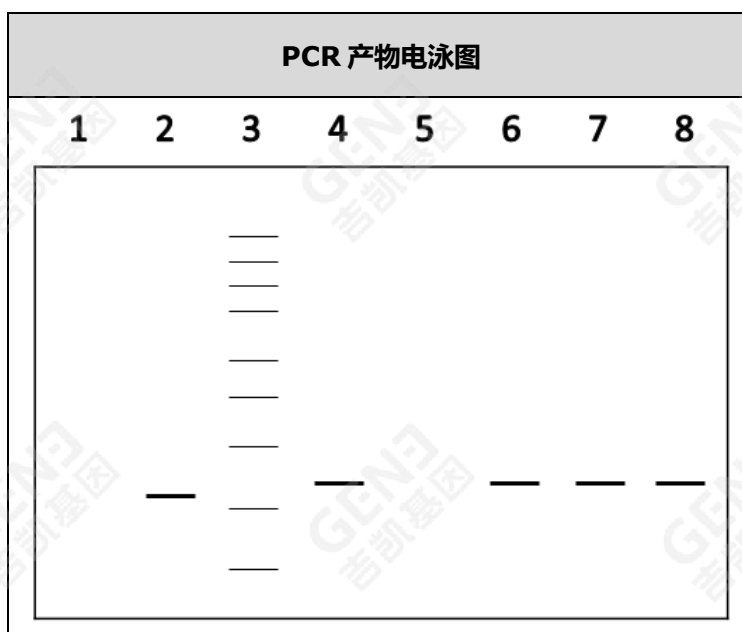
试剂	体积 (μL)
ddH ₂ O	9.2
2× Taq Plus Master Mix	10
上游引物 (10 μM)	0.4
下游引物 (10 μM)	0.4
单菌落	-
Total	20

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	∞

- 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。
- 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°C 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：

TAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTAAATTATGTTTTAAATGGACTATCATA
TGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGAC
GAAACACCGGTTCTCCGAACGTGTACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAA
TTTTTGAATTCGGATCCATTAGGCGGCCGCGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCATTAG
TTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT
ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGA
CGTCAATAATGAC

说明：RNAi 慢病毒载体中存在“发卡结构”，发卡结构的紧致与否是由基因本身特性决定，若发卡结构过于紧致则会直接影响测序结果的质量。尽管测序公司针对该问题进行了多次优化，也难以保证每个 RNAi 载体都能测通，因此测序结果会出现提前中断或前半部分测序 ok，后半部分测序乱峰的情况。对此，我们根据多年的经验判断，两个中断的测序结果如果前半部分序列相同且与目的序列一致，则该克隆即为正确克隆的可能性达 99%。

五、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 μl 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。

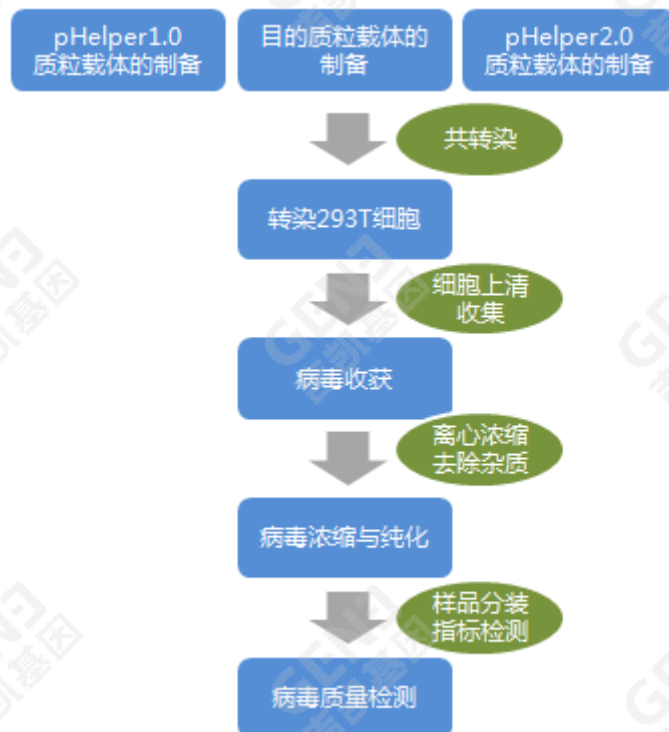
第二部分 慢病毒包装与质量检测

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, 为贴壁依赖型成上皮样细胞, 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。

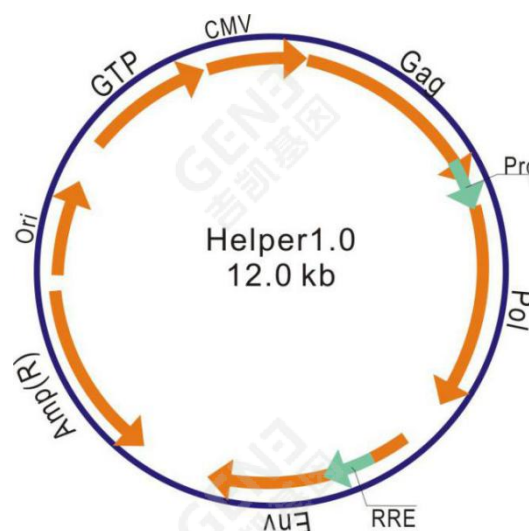
3. 病毒载体

1)GV 载体图谱：

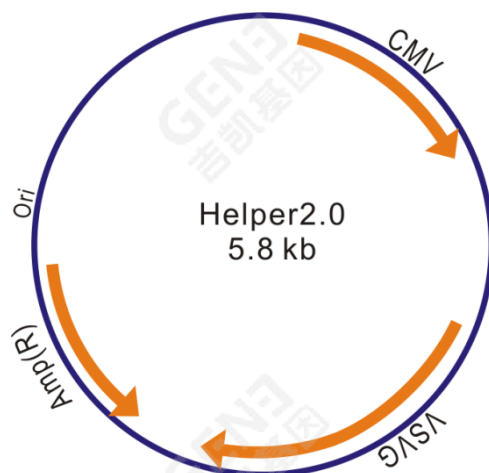
具体结构请参考“慢病毒载体构建手册”

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	上海振样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 $\mu\text{g/ml}$ 。继续培养 1 天，观察细胞生长状况。

病毒样品稀释说明：

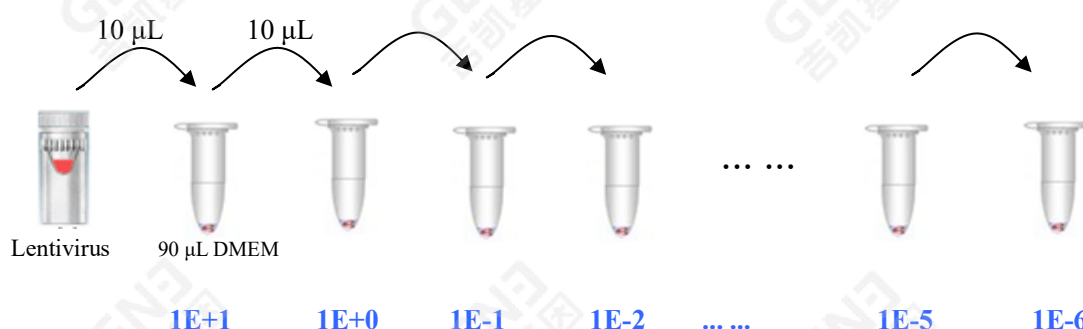


图 1 病毒稀释过程

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 $1\text{E}-6 \mu\text{l}$ ，如图 1。

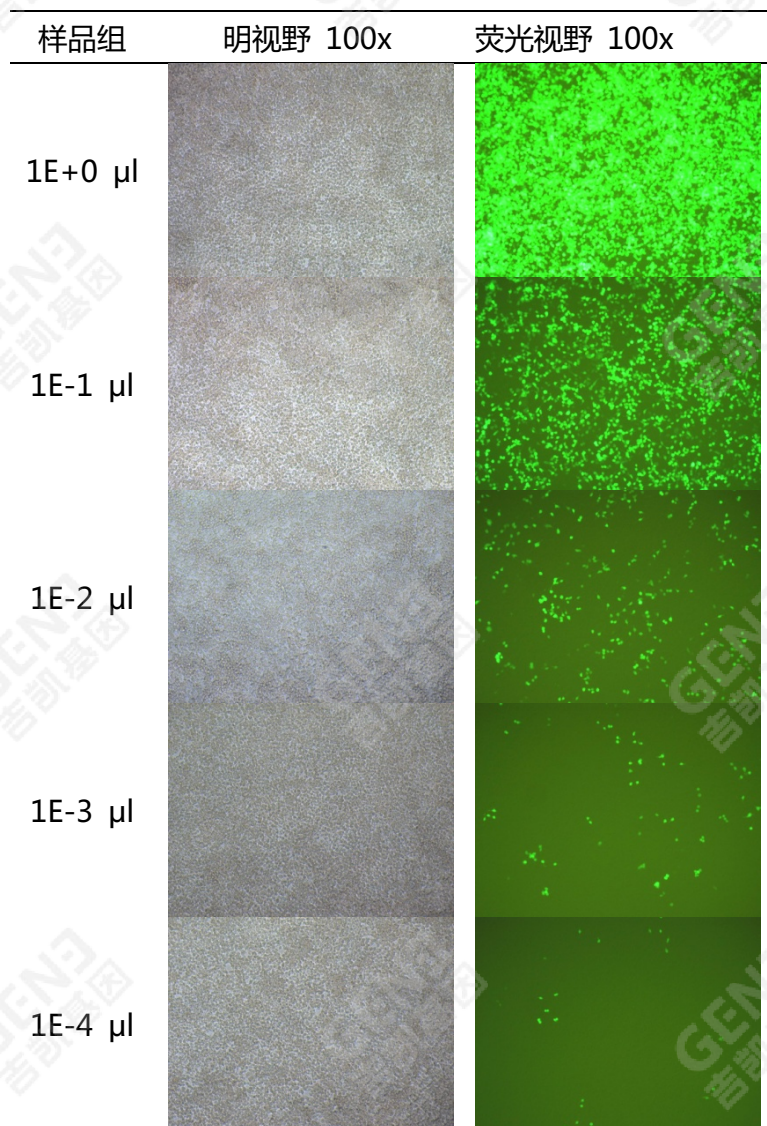
滴度分析

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 $1\text{E}-6 \mu\text{l}$ 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

$$\text{病毒滴度} = \text{荧光细胞数} / \text{病毒原液量} = 2 / (1\text{E}-6) = 2\text{E}+6 \text{ (TU}/\mu\text{l}) = 2\text{E}+9 \text{ (TU/ml)}$$

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 $1\text{E}-5 \mu\text{l}$ 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

$$\text{病毒滴度} = \text{活细胞数} / \text{病毒原液量} = 3 / (1\text{E}-5) = 3\text{E}+5 \text{ (TU}/\mu\text{l}) = 3\text{E}+8 \text{ (TU/ml)}$$



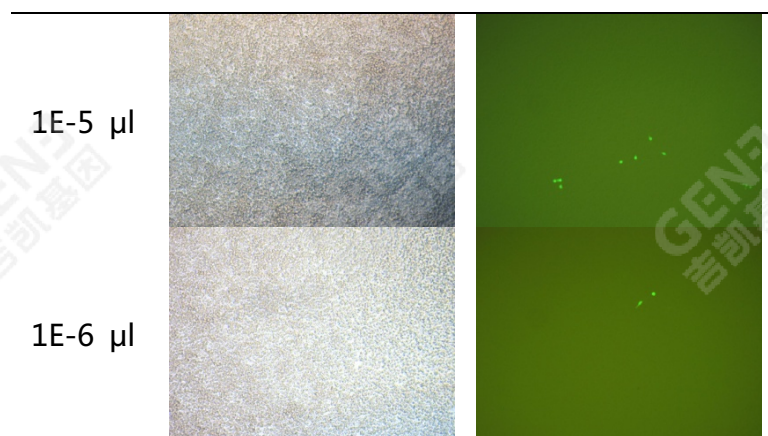
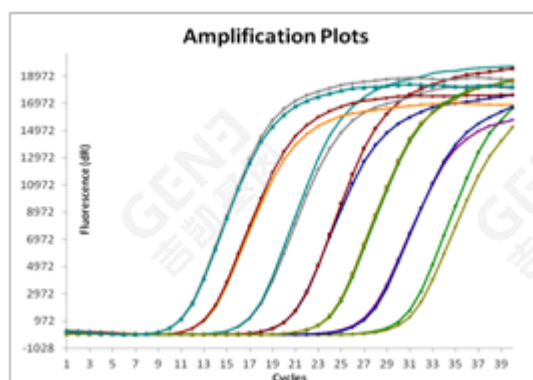


图 2 滴度荧光照片[仅供参考]

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) = $N \times C / V$

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 $1E+10\text{copy}/\mu\text{l}$ ，分装后 -80°C 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 $10\mu\text{M}$ 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 $5E+4\text{cell}/\text{孔}$ 。

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°C, 15s, 之后每一步变性 95°C, 5s, 退火延伸 60°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°C 变性 1min, 然后冷却至 60°C, 1min, 使 DNA 双链充分结合。从 60°C 开始, 每步增加 0.5°C, 保持 30s, 同时读取吸光值。

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

7) 滴度结果

样品	V (μ l)	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：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-Laterrie`re, 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/>