

## 慢病毒沉默贴壁细胞

### 1. 细胞准备

- 1.1 消化计数后调整细胞密度
- 1.2 向细胞培养板加入细胞悬液
- 1.3 37°C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱孵育, 感染时细胞汇合率达 30-50%

### 2. 病毒感染

- 2.1 病毒置于冰上缓慢溶解
- 2.2 弃去孔内原有培养基, 每孔加入1/2体积的新鲜完全培养基
- 2.3 加入计算体积的病毒液, 水平摇匀后置培养箱孵育
- 2.4 感染4小时后补液, 恢复至总体积

### 3. 换液

- 3.1 感染后 24±2小时弃去含病毒培养基
- 3.2 每孔加入总体积新鲜完全培养基

### 4. 效果评估

- 4.1 观察GFP阳性细胞分布及形态
- 4.2 初步评估感染效率

## 常见问题解析

### 1. 对照病毒或目的病毒感染细胞以后，细胞形态发生改变或者细胞死亡？

排查病毒污染：细菌污染使用0.22  $\mu\text{m}$ 滤器（如Millipore）过滤病毒液；真菌污染需丢弃受污染的病毒液；细胞碎片污染需在感染后更换几次新鲜培养基以去除碎片。优化感染条件：MOI过高则降低感染复数；动态观察感染后4 h、8 h、12 h密切观察细胞状态，一旦发现细胞状态恶化，立即更换为新鲜的完全培养基。调整培养条件：若排除污染和MOI问题后细胞状态仍不佳，可尝试增加培养基中血清浓度，观察细胞是否恢复。

### 2. 如何提高慢病毒对细胞的感染效率？

①保证病毒活性：病毒解冻需在冰上进行，严格避免反复冻融，病毒在 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存超过半年，建议重新测定滴度。②优化细胞状态与感染方法：进行预实验评估慢病毒载体对目的细胞的感染适用性；贴壁性差或原代细胞可考虑换用腺病毒载体；悬浮细胞可采用离心感染法，即感染时缩小体积，以增强病毒与细胞接触。③控制感染与观察时间：感染后24 h更换培养基是标准操作。换液过早降低效率；换液过晚增加细胞毒性；慢病毒表达较慢，通常在感染后48 h开始观察荧光，72-120 h甚至更久（尤其增殖慢的细胞）才能达到显著表达。④合理使用助转剂：在1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内测试进行浓度筛选，选择在24 h内不引起明显细胞毒性的最高有效浓度。

### 3. 细胞能被慢病毒感染，但为何GFP荧光很弱？

GFP荧光强度受多种因素影响：①细胞内病毒颗粒数量。进入细胞的病毒拷贝数越多，荧光通常越强。②细胞状态与增殖速度。在增殖快的细胞中，GFP表达通常在72-120 h达到峰值；在增殖慢的细胞中，达到峰值需要更长时间（可能 $>120\text{ h}$ ）。③启动子活性。GFP基因前的启动子强度是关键，强启动子驱动强荧光，弱启动子驱动弱荧光。④观察条件。观察荧光时，务必关闭室内灯光，仅保留荧光显微镜光源，以获得最佳信噪比。