

慢病毒操作手册

☎ 售前tel:400-092-0065

☎ 售后tel:400-092-0566



汉恒生物科技（上海）有限公司

📍 地址：上海浦东新区蔡伦路150号1号楼

✉ 邮箱：service@hanbio.net

☎ 电话：021-51296258

☎ 免费热线：400-092-0065

🌐 <http://www.hanbio.net>

扫一扫 关注汉恒生物公众号
咨询更多服务内容

目录

慢病毒安全使用注意事项

1

慢病毒的存储与稀释

1

慢病毒的感染与使用

2

慢病毒感染细胞预实验(MOI 的摸索)

2

慢病毒感染贴壁细胞

4

特殊细胞的感染注意事项

5

慢病毒稳定株的筛选

6

慢病毒使用FAQ

7

附 1:慢病毒 MOI 感染参数

11

附 2:慢病毒滴度测定方法简介

13



慢病毒安全使用注意事项

- 1、慢病毒相关实验请在生物安全柜 (BL-2 级别) 内操作。
- 2、操作病毒时请穿实验服,佩戴口罩和手套,尽量不要裸露双手及手臂的皮肤。
- 3、操作病毒时特别小心病毒溅出。如果操作时超净工作台有病毒污染,请立即用 70%乙醇加1%的SDS 溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头,离心管,培养板,培养液请用84消毒液浸泡后统一处理。
- 4、如需要离心,应使用密封性好的离心管,如有必要请用封口膜封口后离心。
- 5、病毒相关的废弃物需要特殊收集,统一经高温灭菌处理。
- 6、实验完毕用肥皂清洗双手。



慢病毒的存储与稀释



1、慢病毒的储存

收到病毒液后如在短期内使用慢病毒进行实验,可以将病毒暂时放置于4℃保存(尽量一周内用完);如需长期保存请分装后放置于-80℃。

- 注

a. 在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融,反复冻融会降低病毒滴度(每次冻融会降低病毒滴度10%-50%);我们前期对病毒进行了分装(200 μL/tube),收到后直接放置-80℃保存即可。
- b. 如果病毒储存时间超过6个月,我们建议在使用前重新测定病毒滴度(滴度测定方法见附2)。



2、慢病毒的稀释

当需要稀释病毒时,请将病毒取出置于冰浴融解后,使用培养目的细胞的PBS或无血清培养基(含血清或含双抗不影响病毒感染)混匀分装后置于4℃保存(请尽量一周内用完)。如原病毒标记的滴度为1x10⁸TU/mL,取10uL至90uL的常规培养基中,即可得到1x10⁷TU/mL滴度的病毒。

慢病毒的感染与使用

助转剂polybrene的选择

Polybrene是带正电的小分子，与细胞表面的阴离子结合，提高慢病毒对细胞的感染效率，通常加入polybrene能提高感染效率10~30%。

Polybrene有一定的细胞毒性，有的细胞对Polybrene的毒理反应明显，因此细胞是否适合Polybrene需要摸索；不同细胞对Polybrene的敏感度不同，可以用1~10ug/mL的范围筛选合适的浓度，以24h内细胞无明显毒性反应为佳，可参考文献并进行预实验摸索，Polybrene最常用工作浓度为4~8 μg/mL。

- 注 a. 汉恒生物的自产的Polybrene 产品，用户可用以进行辅助感染。提供的Polybrene母液保存在-20℃(可保存1年以上)，避免反复冻融3次以上，否则活性受影响。4℃可保存2周。
- b. Polybrene预实验请先使用对照病毒进行摸索，部分细胞系MOI及Polybrene 的使用范围请参见附1。

MOI的摸索 慢病毒感染细胞预实验

MOI (Multiplicity of Infection, 感染复数) 是指每个细胞感染的病毒数，通常MOI越高，病毒整合到染色体的数量以及目的蛋白的表达量越高。对于分裂活跃的细胞，比如Hela、293细胞，MOI=1~3时，80%以上的细胞均表达目的基因。而对于非分裂细胞，如原代细胞，感染效率较低，需要进行MOI梯度摸索实验，选择适合的MOI进行实验。

96孔板摸索MOI :

Day 1: 细胞准备

以293T细胞为例，将生长状态良好的目的细胞消化计数后稀释至1×10⁵/mL，96孔板铺板，100μL/孔(1×10⁴个细胞)，放入37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜。接种细胞数量因细胞的生长速度而略有不同，一般是保证第二天进行病毒感染的时候细胞汇合率介于30%至50%。

Day 2: 病毒感染 (1/2小体积感染法)

我们推荐1/2小体积感染法，即病毒感染时，加入1/2体积新鲜培养液，加入慢病毒感染4h后补足至培养体积。具体步骤如下。

感染前，从冰箱取出并在冰上慢慢融化病毒，吸去细胞原有培养基，加入1/2体积新鲜培养基，96孔板则加入50μL培养基，取值MOI=3, 10, 30, 100，将病毒原液加入细胞中，轻轻混匀，对于需要加入polybrene的细胞，可同时加入适量polybrene。

不同的MOI值加入的病毒量见下表。

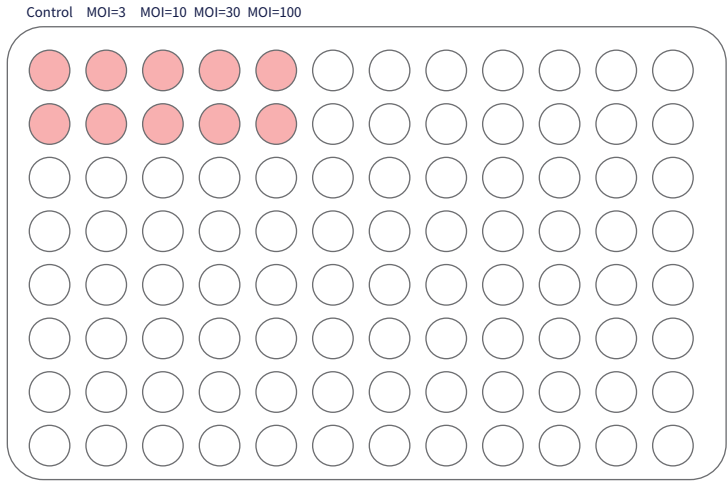


图1 96孔板示意图

- 注 保持细胞形态清晰、生长良好、无污染，为了减小误差，推荐平行感染2~3个复孔。

表1 96孔板每孔不同MOI值加入病毒液体积

细胞数量	MOI值	病毒滴度	病毒液体积
1×10 ⁴	3	10 ⁸ TU/mL	0.3μL
1×10 ⁴	10	10 ⁸ TU/mL	1μL
1×10 ⁴	30	10 ⁸ TU/mL	3μL
1×10 ⁴	100	10 ⁸ TU/mL	10μL

- 注: 每孔加病毒量 (μL) = MOI x 细胞数/病毒滴度 (TU/mL) × 1000

Day 3:换液	感染后第二天(约24h),吸去含有病毒的培养液,换上新鲜的完全培养液,继续37℃培养。
Day 4~5: 观察荧光	感染48h后显微镜初步观察荧光。感染72h后,感染效率在80%左右,且细胞生长状态良好的组,对应的感染条件和MOI即可作为后续感染实验的依据。

注 如果病毒不表达荧光,还可以通过目的基因的qPCR、WB、免疫荧光、免疫组化等方法摸索最佳MOI。

慢病毒感染贴壁细胞

Day 1: 细胞准备

Day 2: 病毒感染
(1/2小体积感染法)

以293T细胞为例,将状态良好的目的细胞接种到24孔板,使细胞浓度为 3×10^5 /mL,500μL/孔,每孔的细胞数量约为 1.5×10^5 个,接种细胞数量因细胞的生长速度而略有不同,一般是保证第二天进行病毒感染时细胞汇合率介于30%至50%之间。放入37℃,5% CO2 培养箱中培养过夜。

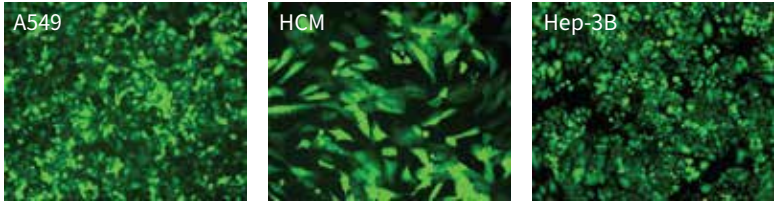
我们推荐1/2小体积感染法,即病毒感染时,加入1/2体积新鲜培养液,慢病毒感染4h后补足至培养体积。

24孔板的培养液体积为500μL,1/2培养体积为250μL,其他大小的培养皿的培养液体积见下表。

表2 不同培养皿加入的培养液体积(1/2培养体积感染法)

培养皿类型	表面积/cm ²	完全培养体积	病毒感染时体积
96-well	0.3 cm ²	100 μL	50 μL
24-well	2 cm ²	500 μL	250 μL
12-well	4 cm ²	1 mL	500 μL
6-well	10 cm ²	2 mL	1 mL

注 慢病毒感染4h后补足至培养体积,感染24 h后换液。

	感染前,从冰箱取出病毒并在冰上慢慢融化,吸去细胞原有培养基,加入1/2体积新鲜培养基,根据摸索的MOI值,加入合适体积的病毒进行感染(每孔加病毒量(μL)=MOI x 细胞数/病毒滴度(TU/mL) × 1000)。需要加入polybrene的细胞,可同时加入适量polybrene。慢病毒感染4h后补足至完全培养体积。 注 融化的病毒置于冰上。反复冻溶或长时间将病毒颗粒暴露于常温会使病毒效价降低。
Day 3:换液	感染后第二天(约24h),吸去含有病毒的培养液,换上新鲜的完全培养液,继续37℃培养。
Day 4~5: 观察荧光	感染后48h,对于带GFP报告基因的病毒,可通过荧光显微镜初步观测GFP表达效率。一般感染后72h可达到表达高峰。对于携带Puromycin抗性基因的病毒,换上含适当浓度Puromycin的新鲜完全培养液,筛选稳定转导的细胞株(详见下方)。  图2 慢病毒感染细胞荧光图

特殊细胞的感染注意事项

1、感染悬浮细胞
感染悬浮或半悬浮细胞,则需要通过平角离心转染法,先重悬细胞,然后将适量的病毒液加入细胞培养皿后,封好口,放入平角离心机,低速(1200g)离心1h,然后放入培养箱中正常培养即可。若由于实验条件有限,没有平角离心机,可用离心管代替,将细胞吹打吸入离心管中,进行低速离心,去掉大部分上清,然后加入适量的病毒液,室温放置15min(尽量不要超过30min),然后将细胞和病毒液同时吸出转入培养皿中继续病毒感染过夜即可。

2、对于极难感染的细胞

对于极难感染的细胞,如DC(树突状细胞)等,可采用多次感染的方法:24h后待细胞生长到合适的汇合度且细胞状态良好情况下进行复感染,如需传代等传代后细胞汇合度和状态稳定后再进行复感染。

3、传代能力较差的原代细胞

对于一些传代能力较差的原代细胞,比如BMSC等,建议采用滴度更高的腺病毒进行感染。

puromycin筛选

构建慢病毒稳转株

puromycin筛选即使用带有puromycin抗性的病毒感染目的细胞,使目的细胞具有puromycin抗性。之后再利用 puromycin 药物处理感染后的细胞,从而筛选出成功感染病毒的细胞。

1、确定puromycin的最适浓度

puromycin的建议工作浓度为1~10 μ g/mL。在筛选之前,需摸索能够杀死空细胞的最低puromycin浓度:可将细胞铺24孔板,使第二天融合率约为50~60%,24h后更换含不同浓度puromycin的完全培养基(可先文献查询细胞的puromycin浓度,再设置合理的浓度梯度)。puromycin梯度可设置为0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 μ g/mL 处理 48h,选取能够杀死90%以上空细胞的最低浓度进行后续实验。

2、进行puromycin筛选

筛选时,请设置未感染病毒的空细胞对照实验组,并加入等量浓度的puromycin。

慢病毒感染48-72h后,感染效率约在80%左右时,并在细胞汇合度在60-70%时,以摸索到的puromycin浓度进行处理(具体以细胞状态而定,细胞状态稳定后加)。加药约48h观察对照组空细胞的死亡情况,若空细胞组细胞死亡率达90%以上,撤掉puromycin换新鲜的培养基培养。后期可根据空细胞的生长速度进行定期药筛。

3、筛选细胞的放大培养

puromycin 筛完后,待细胞长满可按适当比例传代培养,等到扩增到一定的细胞数量后即可进行单克隆稳定株筛选或混合克隆稳定株筛选。

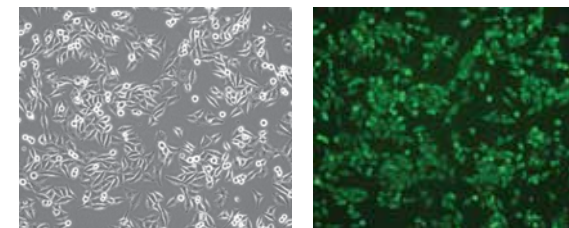


图3 MGC-803细胞稳定株筛选

FAQ

慢病毒的使用FAQ

Q₁ 什么是MOI? 如何通过MOI计算需要加入的病毒量?

MOI,感染复数,是指每个细胞感染的病毒数,通常需要MOI值越高的细胞越难被感染。一般我们把某株细胞有80%被感染时所用的病毒颗粒数和细胞数目的比值作为该株细胞的MOI。



相关计算公式: 每孔加病毒量(μ L)=MOI x 细胞数/病毒滴度(TU/mL) $\times$ 1000
MOI=(病毒滴度 $\times$ 病毒体积)/细胞数目

Q₂ 如何确定向细胞中加入慢病毒的最佳时间?

慢病毒感染细胞后2~3天可观察慢病毒携带的基因表达,在细胞汇合度30~50%且细胞状态良好时加入慢病毒,确保在感染后2天时细胞增长达到70%左右的汇合度。

Q₃ 用于慢病毒感染的细胞接种量是多少？

根据细胞增殖的速度调整细胞接种量，以保证在感染后3天左右细胞刚好快长满培养皿底部为宜。

针对大部分细胞系：传代周期在2~3天，感染时细胞铺板的密度保持在30~50%左右

针对某些原代细胞：由于细胞增长缓慢，可以在接种时提高汇合度到70~80%左右

针对非分裂细胞：如神经元细胞，接种后不再增殖，此时可以按照100%的汇合度进行接种。

Q₄ 慢病毒感染细胞后什么时候基因表达达到峰值？

慢病毒感染后大部分细胞会在3天左右GFP或目的基因表达达到峰值，但是对于生长缓慢的细胞，达到峰值的时间会更长。

Q₅ 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？

首先，确定病毒是否有污染；

- ① 细菌污染，病毒用Millipore 0.22um过滤器过滤去除细菌；
- ② 真菌污染，病毒直接丢弃；
- ③ 细胞碎片，感染后换液几次去除细胞碎片；

其次，确定病毒感染MOI是否过高，降低MOI值，并在感染后的4h、8h、12h对细胞进行观察，若发现细胞状态变差时，则需要使用新鲜的完全培养液替换病毒感染培养液。

排除以上因素后细胞状态仍然不好，尝试增加血清含量，观察细胞状态是否好转。

Q₆ 如何提高慢病毒对细胞的感染效率？

慢病毒对细胞的感染效率受多种因素影响，如病毒活性、细胞自身的状态、MOI值、感染时间等。

- ① 病毒活性，解冻病毒一定要在冰上进行，尽量避免反复冻融。-80℃保存半年以上需要重新测滴度；
- ② 目的细胞，先进行预实验测试，看病毒载体是否合适感染目的细胞。一些难感染的细胞，如贴壁不好的细胞，原代细胞等适合用腺病毒；对于悬浮细胞，可采用离心感染的方法，减少病毒感染时的体积，从而提升感染的效率；
- ③ MOI值，进行MOI梯度摸索实验，找出最优的MOI浓度；
- ④ 感染时间，慢病毒/逆转录病毒一般在感染后24h换液，太早换液会导致感染效率下降；换液太晚，则对细胞的损伤太大。感染后48h开始观察荧光，由于慢病毒表达时间较长，有的72h、120h才能看到荧光；
- ⑤ 助转剂，Polybrene有一定的细胞毒性，不同细胞对polybrene的敏感度不同，可以用1-10μg/mL的范围筛选合适的浓度，以24h内细胞无明显毒性反应为佳；



慢病毒带puromycin抗性的可以用嘌呤霉素筛选，也可提高阳性细胞率。

Q₇ 细胞能被慢病毒感染，但为何GFP荧光很弱？

GFP慢病毒感染细胞后，荧光强度取决于病毒进入到细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、细胞类型、观察时间、GFP前的启动子活性等因素。

GFP基因荧光表达的强度与启动子的活性、目的细胞感染的病毒颗粒数呈正相关。慢病毒在增殖较快的细胞中感染72~120h，GFP蛋白表达才达到峰值；在增殖较慢的细胞中，GFP蛋白表达达到峰值需更久。GFP基因接在强启动子后面时荧光表达较强，弱启动子则荧光表达较弱。

观察荧光时最好关掉室内灯光，只留荧光显微镜光源。

Q₈ 为什么过表达慢病毒比对照的荧光要暗？

每种病毒有自己的载体容量，基因的插入会影响位于其下游的荧光蛋白等基因的表达。

对照病毒或干扰病毒，由于没有插入基因或者插入基因非常短，荧光通常较强。而插入了较长基因之后，荧光的亮度会随着插入基因的长度以及特殊结构的存在等而减弱，尤其是出现高GC片段，由于影响了转录，荧光强度会大大降低。

Q₉ 要曝光很长时间才能观察到荧光？

可能的原因有：

- ① 显微镜汞灯使用时间长，可以通过对照病毒排除，若对照较亮可排除显微镜问题；
- ② pH值低，看培养基是否发黄，pH值较低会导致绿色荧光淬灭；
- ③ 目的病毒光不亮，插入目的基因后的病毒荧光强度会相对对照弱一些，属于正常现象，可加长曝光时间。

Q₁₀ 在进行基因表达验证时，QPCR有效果，但是WB效果不好？

QPCR有效，WB检测没有过表达的可能原因有：

- ① 检测标签表达，确认标签是否表达，若标签是外源性的，则更容易检测到；
- ② WB直接检测目的蛋白，受到抗体的质量（包括抗体有效性和灵敏度）操作等影响较大。另外，如果基因翻译受阻，或者出现代偿性上升/下调等都会导致WB检测不到。

Q₁₁ 为什么做WB用flag检测有过表达,用目的蛋白的抗体检测没有过表达?

这种情况存在以下几种可能

① 两种抗体灵敏度不同

② 过表达量被本底表达掩盖,基因在细胞中本身有较高的内源性表达量,过表达之后用目的蛋白抗体WB检测到的条带比本底的浓度只高一点,因此并不明显,如果上样浓度有差异就会被掩盖。而flag抗体是有或无的区别,因此能明显看出差别。

③ ORF出现突变或移码,表达的不是目的蛋白。可通过检查测序结果和对照flag抗体做出的条带大小来初步排除。测序结果没有突变,而flag检测到的蛋白和理论大小差不多,证明ORF能正常翻译,出现移码的可能性不大。

④ 基因有多个转录本,目的蛋白抗体只能检测到其中某一种或几种表达形式,可以查看一下抗体的抗原表位,理论上是否能结合。

Q₁₂ RNA干扰无效果是什么原因?有什么解决办法吗?

1、确认感染效率:干扰与过表达不同,干扰的效率很大程度上决定于感染效率(假设siRNA的下调效率是80%,但只有50%的细胞感染上,那整体水平上来说,至多只有40%的下调效率)。

2、确认QPCR数据:

① 检查QPCR引物是否有问题,我们设计的位置主要在CDS区,最好用CDS区的引物来检测,比对一下种属基因是否正确。

② 查看溶解曲线峰图,是否平滑,是否有杂峰,是否峰值在80℃以下,如有以上情况可能PCR结果不准确。

③ 查看CT值,复孔之间是否均一,干扰对复孔的均一性要求很高,如复孔间误差超过1,计算后会造成50%左右的下调误差。除复孔均一性外,也要注意CT值大小,有些基因内源性表达极低,CT值接近或超过30,这种低表达的基因再进行下调,本身意义不大,建议更换靶细胞。

Q₁₃ siRNA下调效果很好,但是包装成shRNA病毒后,下调效果变差?

siRNA和shRNA在结构上是不一样的,siRNA为化学合成,使用浓度一般为5uM,浓度较高,瞬时转染时如细胞转染效率尚可,瞬时进入细胞中的分子数超过10⁸,且不需要经过剪切加工就可和靶点结合,干扰效率高。

shRNA则是将干扰基因克隆到DNA上,经过病毒整合(慢病毒)或非整合(腺病毒,腺相关病毒)进入到细胞后,转录形成发夹RNA,再经过一系列酶的剪切加工,才形成可以和靶点结合的干扰RNA。这个过程中因为拷贝数低(如慢病毒需要整合基因组),转录加工过程复杂,会导致干扰效果不理想。

另外,单从碱基数上来说,siRNA一般为19nt, shRNA一般长度为21nt或25nt,所以有效的siRNA,往往有可能会出现并不合适做成shRNA的情况。

Q₁₄ microRNA sponge 没有效果?

确认感染效率,收样时间(一般48h有效果)。miRNA sponge作用机理为竞争性结合miRNA,不会导致miRNA降解,因此建议通过检测miRNA作用靶点的方式验证miRNA sponge的功能。

Q₁₅ 慢病毒筛选稳转株之后,培养一段时间检测没有过表达(干扰)效果?

慢病毒感染细胞用puromycin筛选得到稳转株之后,需要定期使用含有puromycin的培养基培养细胞,以免出现基因丢失的情况。建议后期培养浓度可以按照1/10~1/2的筛选浓度。

附1 慢病毒MOI感染参数

注 不同实验室由于细胞的来源、代数和细胞状态等因素的影响,MOI值也略有差异,以下数据是在细胞感染效率在85-100%细胞状态良好的情况下获得的,仅供参考。

细胞系	细胞描述	MOI值范围	能否添加polybrene
K562	人白血病细胞	20~40	可
Jurkat	人白血病细胞株	50~100	可
kasumi	人白血病细胞株	10~100	低浓度
NB4	人白血病细胞株	50~80	低浓度
U937	人单核细胞	20~40	可
THP-1	人单核细胞株	50~100	可
GBC-SD	人胆癌细胞株	30~50	低浓度
H929	人多发性骨髓瘤细胞系	100~150	可
H1299	人非小细胞性肺癌细胞	10~40	可
95D	人高转移肺癌细胞	50~100	可
A549	人肺腺癌	10~40	可
SPC-A-1	人肺腺癌细胞	10~30	可
BEL-7402	人肝癌细胞	10~20	可
Hep 3B	人肝癌细胞	10~30	不建议
Hep G2	人肝癌细胞	10~30	可
SMMC-7721	人肝癌细胞	10~30	可
Huh-7	人肝癌细胞系	10~30	可
Hela	人宫颈癌细胞株	10~30	可
HOS	人骨肉瘤细胞系	20~50	可

细胞系	细胞描述	MOI值范围	能否添加polybrene
Hep-2	人喉癌细胞株	10~30	可
HL-60	人急性髓系白血病细胞株	>100	可
HT-29	人结肠癌细胞	10~30	可
HCT116	人结肠癌细胞	15~40	可
SW480	人结肠癌细胞株	10~30	可
DLD-1	人结直肠肿瘤细胞株	10~50	可
SK-OV-3	人卵巢癌细胞株	10~50	可
SHG-44	人脑胶质瘤细胞	10~100	可
U251	人脑胶质母细胞瘤	20~100	可
U87	人脑星型胶质母细胞瘤	20~100	可
293T	人胚肾上皮细胞	5~20	可
HUVEC	人脐静脉血管内皮细胞	10~30	可
PC-3	人前列腺癌细胞	10~40	可
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10~50	可
MCF-7	人乳腺癌细胞株	10~40	可
Tca8113	人舌鳞状细胞癌	10~30	可
RPE	人视网膜色素上皮细胞	3~30	可
AGS	人胃癌细胞	30~100	可
BGC-823	人胃癌细胞	20~50	可
SGC-7901	人胃癌细胞	10~100	可
MKN-28	人胃癌细胞株	20~40	可
MKN-45	人胃低分化腺癌细胞株	20~40	可
BxPc-3	人胰腺癌细胞	10~40	可
CFPAC-1	人胰腺癌细胞	10~80	可
Panc-1	人胰腺癌细胞	10~20	可
HEC-1-B	人子宫内膜癌细胞株	20~100	可
NIH-3T3	小鼠成纤维细胞系	20~80	可
Raw264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10~50 (感染后分化)	可
CHO	中国仓鼠卵巢细胞	10~40	可
HSC-T6	大鼠肝星型细胞	10~30	低浓度
C6	大鼠脑胶质瘤细胞	10~50	可
NRK-52E	大鼠肾细胞	20~30	可
-	大鼠软骨细胞	30~100	可
-	大鼠肝星状细胞	>75	低浓度
-	大鼠骨髓间充质干细胞	20~100	可
-	大鼠乳鼠心肌细胞	20~100	可
-	大鼠软骨细胞	30~100	可
-	大鼠神经元细胞	10~50	低浓度
-	大鼠雪旺氏细胞	20~50	可
-	人骨髓间充质干细胞	25~150	低浓度
-	人胚胎干细胞	10~300	低浓度
-	人血管平滑肌细胞	50~100	可
-	小鼠骨髓间充质干细胞	20~100	低浓度
-	小鼠神经元细胞	10~50	低浓度
-	小鼠小胶质细胞	3~50	可
-	小鼠神经干细胞	10~100	低浓度
-	小鼠胚胎干细胞	10~100	低浓度

附2 慢病毒滴度测定方法简介

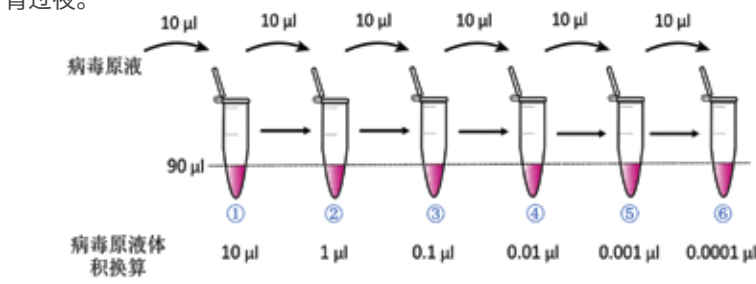
表达荧光的慢病毒

Day 1

生长状态良好的 293T 细胞消化计数后稀释至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ，加入96孔板， $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ (1×10^4 个细胞)，每种病毒需要6个孔。放入 37°C ，5% CO_2 培养箱中培养过夜。

Day 2

在EP管中做10倍梯度稀释，连续6个稀释度。稀释方法如下：每种病毒准备6个1.5 mL EP 管，每管加入 $90\ \mu\text{L}$ 完全培养基，往第一个管中加入 $10\ \mu\text{L}$ 病毒原液，混匀后，吸取 $10\ \mu\text{L}$ 加入第二个管混匀。以此类推。然后把稀释好的病毒和细胞孵育过夜。



Day 3

吸去带有病毒的培养液，在每个孔中再加入 $100\ \mu\text{L}$ 完全培养液，以利于细胞的生长。

Day 4

显微镜观察荧光。此时荧光会有初步表达。

Day 5

在荧光显微镜下观察结果，对荧光比例合适 (10~30%之间) 的孔进行细胞计数，并计算滴度。



相关计算公式：
滴度 (TU/mL) = 细胞数 $\times$ 荧光百分比 $\times 10^3$ / 病毒原液体积 (μL)。
举例：③号管对应孔的荧光比例为30%，细胞总数为 8×10^4 ，
滴度 (TU/mL) = $8 \times 10^4 \times 30\% \times 10^3 / 0.1 = 2.4 \times 10^8$
如果要感染 2×10^5 个细胞， $\text{MOI} = 30$ (1个细胞对应30个病毒粒子)
(见下注)，则需要病毒体积为 $= 2 \times 10^5 \times 30 / 2.4 \times 10^8 \text{ (mL)} = 0.025 \text{ mL} = 25\ \mu\text{L}$ 。

注 MOI值: MOI 是multiplicity of infection的缩写，中文译为感染复数，实际的含义即为每个细胞被多少个有活力病毒所感染。各种细胞的最适MOI值有差别，请客户正式实验前先行预实验摸索最适MOI。